

**Der Ursprung der frühen Nachdepolarisation
beim Aktionspotential der
Skelettmuskelfaser des Frosches**

Wolfgang Daut

—

1976
—

Aus dem Department of Physiology,
School of Medicine and Dentistry,
University of Rochester, New York, U.S.A.

Direktor: Prof. Dr. Paul Horowicz

Der Ursprung der frühen Nachdepolarisation

beim Aktionspotential der

Skelettmuskelfaser des Frosches

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Daut

aus

Kallstadt

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Gerrit ten Bruggencate
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Adolf Schrader
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.1976

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung - - - - -	Seite	3
Problemstellung - - - - -	"	5
Einleitung - - - - -	"	8
Die Membran der Skelettmuskelfaser - - - -	"	8
Aktionspotentialmechanismus - - - - -	"	8
Die Nachdepolarisation - - - - -	"	10
Das transversale tubuläre System im Skelettmuskel		
Morphologie des tubulären Systems	"	12
Funktion des tubulären Systems	"	14
Zusammenhänge zwischen früher Nachdepolarisation, tubulärem System, Glycerinbehandlung und elektromechanischer Kopplung - - - - -	"	16
Elektronenoptische Aufnahmen des tubulären Systems - - - - -	"	24
Methoden - - - - -	"	26
Versuchsmaterial und Seziertechnik - - - -	"	26
Aufbau zur intrazellulären Potentialableitung	"	27
Durchführung eines typischen Experimentes	"	39
Glycerinbehandlung - - - - -	"	40
Kompletter Versuchsaufbau - - - - -	"	42
Ringerlösungen - - - - -	"	43
Ergebnisse - - - - -	"	44
Einfluß der Glycerinbehandlung auf die frühe Nachdepolarisation - - - - -	"	44
Das Konzept des "Gleichgewichtspotentials"	"	48
Veränderung des Membranpotentials - - - -	"	49
Einfluß der Temperatur auf die frühe Nachdepolarisation - - - - -	"	52
Einfluß der Repolarisationsgeschwindigkeit und der Spikeamplitude auf die frühe Nachdepolarisation - - - - -	"	55

Diskussion - - - - -	Seite	57
Methodik der Glycerinbehandlung - - - -	"	57
Abhängigkeit von der Temperatur - - -	"	57
Volumenänderungen - - - - -	"	59
Widersprüche zu Gage und Eisenberg - - -	"	62
Zusammenhang zwischen transversalem, tubulärem System und der frühen Nach- depolarisation - - - - -	"	64
Einfluß von Membrankapazität und Repolarisationsgeschwindigkeit auf die frühe Nachdepolarisation - - - - -	"	65
Worauf beruht die frühe Nachdepolarisation	"	68
Anhang		
Kabelanalyse der Muskelfaser - - - - -	"	75
Literaturverzeichnis - - - - -	"	83

Zusammenfassung

Um den Ursprung der frühen Nachdepolarisation im Froschmuskul zu erforschen, wurden Aktionspotentiale von normalen und von glycerinbehandelten Muskelfasern abgeleitet und verglichen; dabei wurde das Membranpotential durch einen intracellulär injizierten Strom variiert. Es stellte sich heraus, daß die frühe Nachdepolarisation vom Membranpotential abhängig ist; seine Größe und Richtung erscheinen in einem weiten Bereich proportional der Differenz zwischen Membranpotential und einem "Gleichgewichtspotential". Das Vorzeichen der frühen Nachdepolarisation hängt also davon ab, ob das Membranpotential negativer oder positiver als das "Gleichgewichtspotential" ist. Dieses "Gleichgewichtspotential" der frühen Nachdepolarisation liegt bei glycerinbehandelten Fasern bei - 63 mV und bei Kontrollfasern bei - 45 mV. Aus der Tatsache, daß der Mechanismus, der der frühen Nachdepolarisation zu Grunde liegt, durch die Glycerinbehandlung zwar beeinträchtigt wird, aber immerhin noch existiert, kann geschlossen werden, daß entweder die frühe Nachdepolarisation ihren Ursprung nicht oder nicht ausschließlich im T-System hat, oder aber daß die Glycerinbehandlung die T-Tubuli nicht vollkommen funktionsunfähig macht.

Es stellte sich heraus, daß es neben der Glycerinbehandlung eine andere Bedingung gibt, unter der die frühe Nachdepolarisation in sehr ähnlicher Weise verändert wird; diese Bedingung besteht in einer Abkühlung der Muskelfaser auf 10°C . Durch Vergleich der Effekte dieser Abkühlung und der Glycerinbehandlung konnte gezeigt werden, daß die Membrankapazität im Skelettmuskel und die Repolarisationsgeschwindigkeit keine wesentliche Rolle bei der Genese der frühen Nachdepolarisation spielen.

Durch Änderung der Ionenkonzentrationen der benutzten Ringerlösungen und die in der Diskussion dargelegten Überlegungen konnten Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, daß die frühe Nachdepolarisation nicht durch Na^{+} -Ströme vermittelt wird, sondern zumindest teilweise auf K^{+} -Strömen beruht.

Problemstellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der frühen Nachdepolarisation beim Aktionspotential der Skeletmuskelfaser des Frosches.

Der Mechanismus zur Bildung eines Aktionspotentials am Froschmuskel wurde von Katz (Katz '48) im Detail beschrieben; im wesentlichen gleicht er dem Aktionspotentialmechanismus einer Nervenfaser, welcher in der Einleitung genau beschrieben wird.

Ungeklärt allerdings ist bis jetzt die Ursache der frühen Nachdepolarisation am Skeletmuskel. Seit einiger Zeit gibt es nun Anhaltspunkte dafür, daß der Unterschied in der Form des Aktionspotentials zwischen Skeletmuskel und Nervenfaser, nämlich die frühe Nachdepolarisation, etwas zu tun haben könnte mit dem charakteristischen morphologischen Unterschied zwischen den beiden Präparaten, der in dem Vorhandensein des transversalen tubulären Systems besteht, welches der Erregungsleitung von der Muskelfaseroberfläche zum Faserinneren dient.

Es konnte gezeigt werden, daß die frühe Nachdepolarisation verloren geht nach Behandlung eines Skeletmuskels mit Glycerin; von dieser Glycerinbehandlung glaubt man, daß sie das transversale tubuläre System im Skeletmuskel selektiv zu zerstören vermag (Howell 1969).

Widersprüchliche Berichte von verschiedenen Autoren über das Verschwinden der frühen Nachdepolarisation in glycerinbehandelten Muskelfasern bzw. über die Reversibilität dieses Effektes machen es aber notwendig, die entsprechenden Experimente unter besser kontrollierten Bedingungen zu wiederholen.

Die Temperatur spielt bei der Glycerinbehandlung eine große Rolle (Henderson 1970). Deshalb wurde die Effektivität der Glycerinbehandlung bei verschiedenen Temperaturen kontrolliert, um die für die Zerstörung des T-Systems günstigste Temperatur zu finden.

Um den Einfluß der Glycerinbehandlung bzw. des Verlustes des T-Systems auf die frühe Nachdepolarisation zu untersuchen, wurden Aktionspotentiale aufgezeichnet von glycerinbehandelten Muskelfasern. Als nicht glycerinbehandelte Kontrollmuskeln wurden Muskeln benutzt, die zur Verhinderung von Kontraktionen in hypertone Ringerlösung eingelegt waren.

In einer Reihe von Experimenten wurde der Effekt der Temperaturerniedrigung bei nicht glycerinbehandelten Fasern untersucht, welcher teilweise dem Glycerineffekt ähnelt. Weiterhin wird der Einfluß der Repolarisationsgeschwindigkeit auf die frühe Nachdepolarisation gemessen und diskutiert.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde versucht eine Entscheidung zu ermöglichen, ob die frühe Nachdepo-

larisation auf einen Na^+ - oder einen K^+ -Strom zurückzuführen ist. Dazu wird der Effekt von Änderungen der extrazellulären Na^+ -Konzentration studiert.

Zur Einführung in den Problemkreis wird im folgenden zunächst kurz auf das Aktionspotential und seinen Entstehungsmechanismus eingegangen. Dann wird im Detail das T-System, sowohl in morphologischer als auch in funktioneller Hinsicht und die Glycerinbehandlung beschrieben; dabei wird die wichtigste diesbezügliche Literatur zusammengefaßt.

Einleitung

Die Membran der Skeletmuskelfaser

Die beiden hervorstechenden elektrischen Merkmale eines Axons bzw. einer Skeletmuskelfasermembran sind erstens ihre Kabeleigenschaften (diese sind im Anhang erläutert) und zweitens die Fähigkeit der Membranen ein Aktionspotential zu propagieren.

Depolarisiert man eine Muskelfasermembran vom Ruhepotential bis zu einem bestimmten Schwellenpotential so reagiert die betroffene Membranstelle durch eine automatische, von weiteren äußeren Einflüssen unabhängige Weiterführung des einmal in Gang gebrachten Prozesses; eine fortschreitende Depolarisation, welche bis über das Nullpotential hinausschießt ist die Folge. Darauf folgt eine ebenfalls durch die Membran selbst induzierte Repolarisation zum ursprünglichen Ruhepotential.

Dieses gesetzmäßige Membranverhalten ist allgemein als Aktionspotential bekannt.

Der Mechanismus zur Bildung eines Aktionspotentials

Im wesentlichen beruht das Aktionspotential auf einem anfänglichen Na^+ -Einstrom in die Zelle, welcher zu der beschriebenen Depolarisation führt, und einem anschließenden K^+ -Ausstrom aus dem Intrazellulärraum heraus während

der Repolarisationsphase. Diesen Ionenströmen liegen selektive Membranpermeabilitätsänderungen für die erwähnten Ionen zu Grunde. Der genaue zeitliche Ablauf der Permeabilitätsänderungen und der verschiedenen Ionenströme wurden am Nerven von Hodgkin und Huxley (1952) genau analysiert.

Heute weiß man, daß die einzelnen Ionensorten durch speziell für sie eingerichtete Kanäle fließen, deren Durchlässigkeit vom Zustand sogenannter "Gates" (Armstrong C.M. 1974) abhängig ist, welche vom Membranpotential reguliert werden, und deren Öffnen und Schließen mit meßbaren Ladungsverschiebungen einhergeht.

Die Permeabilität der Na^+ -Kanäle wird durch Natriumaktivations-Gates (m^3) und durch Natriuminaktivations-Gates (h) reguliert. Der Na^+ -Strom ist proportional m^3h . Die K^+ -Kanäle haben nur eine Gate, das Kaliumaktivations-Gate. Wichtig ist, daß die Natriumaktivations-Gates schneller auf Membranpotentialänderungen reagieren als die beiden anderen Gate-Systeme.

Wenn die Membran einer erregbaren Zelle bis zu ihrem Schwellenpotential depolarisiert wird, steigt als erstes die Na^+ -Aktivierung an, was eine Erhöhung der Na^+ -Leitfähigkeit zur Folge hat. Erhöhte Na^+ -Leitfähigkeit wiederum verursacht weitere Depolarisierung der betroffenen Membranstelle, d.h. das Membranpotential

nähert sich dem Na^+ -Äquilibriumspotential; dies wiederum beschleunigt den Anstieg der Na^+ -Aktivierung, weitere Depolarisation ist die Folge. Fortschreitende Depolarisation schließen nun langsam die Na^+ -Inaktivations-Gates, wodurch die Na^+ -Leitfähigkeit wieder reduziert wird.

Währenddessen macht sich die zunehmende K^+ -Aktivation immer mehr bemerkbar: sie steigert die K^+ -Permeabilität wodurch die Membran mehr und mehr repolarisiert wird. Das Membranpotential nähert sich also wieder dem Ruhepotential.

Nach dem Aktionspotential bleibt ein Teil der K^+ -Kanäle noch für kurze Zeit aktiviert, d.h. die K^+ -Permeabilität bleibt für diese Zeit über dem Wert des steady state. Dies stabilisiert das Membranpotential; das bedeutet, daß zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Erhöhung der Na^+ -Permeabilität nötig wäre, um die Membran zu depolarisieren, als während des steady state. Gleichzeitig können sich viele Na^+ -Kanäle selbst auf eine Membrandepolarisation hin noch nicht wieder öffnen, weil sie noch inaktiviert sind.

Der langsame Anstieg der Na^+ -Inaktivierung und die langsame Verminderung der K^+ -Aktivation bedingen die Refraktärzeit eines Abschnittes der Membran.

Die Nachdepolarisation

Anstelle der im englischen Schrifttum üblichen etwas mißverständlichen Bezeichnungen "early negative afterpotential" und "late negative afterpotential" wer-

den im folgenden die Ausdrücke frühe oder späte Nachdepolarisation gebraucht.

Die Mechanismen der Aktionspotentiale im Nervenaxon (Hodgking & Huxley 1952) und im Skelettmuskel (Katz 1948) sind im Großen und Ganzen sehr ähnlich. Vergleicht man die Form eines Aktionspotentials im Tintenfischriesenaxon mit dem Aktionspotential eines Froschmuskels, so fällt die frühe und späte Nachdepolarisation am Muskel auf: In der Repolarisationsphase des Muskelaktionspotentials kommt das Membranpotential zunächst nicht ganz zum Ruhepotential zurück, sondern beharrt bei einer Depolarisation von 20 - 30 mV.

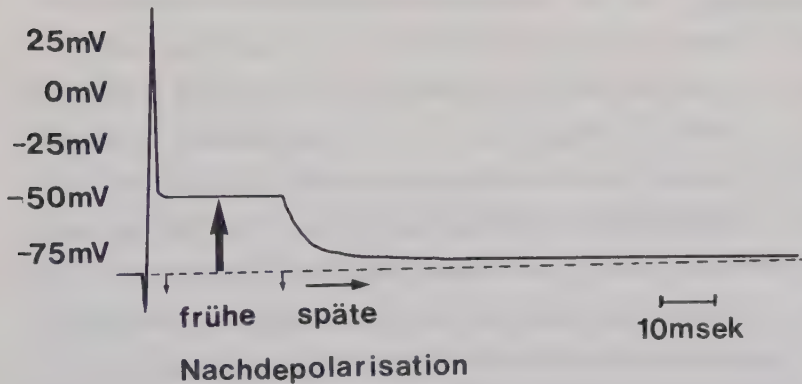


Abb. 1: Muskelaktionspotential mit früher (von ↓ bis ↑) und später Nachdepolarisation (ab →)
↑ bezeichnet die Amplitude der frühen Nachdepolarisation.

Diese frühe Nachdepolarisation dauert bis zu 25 msec. Ihr folgt die späte Nachdepolarisation, eine wenige mV betragende leichte Depolarisation, die gewöhnlich über hundert msec. dauert. Abbildung 1 zeigt ein normales Aktionspotential einer Froschmuskelfaser mit den beiden beschriebenen Nachdepolarisationsphasen. Bevor ich genauer auf die frühe und späte Nachdepolarisation eingehe, halte ich es für notwendig, das transversale tubuläre System der Froschmuskelfaser und die Glycerinbehandlung und deren mögliche Zusammenhänge mit der Nachdepolarisation zu beschreiben.

Das transversale tubuläre System im Skelettmuskel

Morphologie: Mit der Vervollkommenung der Elektronenmikroskopie wurde auch die feine Struktur des intracellulären Membransystems, das auf Längsschnitten als Triade erscheint, genau untersucht. Huxley A.F. (1959) und Anderson-Cedergren (1959) zeigten, daß die zentralen Elemente der Triaden eine zusammenhängende Struktur darstellen, die sie "transversales tubuläres System" oder "T-System" nannten. Franzini Armstrong & Porter (1964) zeigten an einem Fisch und Peachey & Huxley (1964) am Tintenfisch, daß das T-System mit dem Extrazellulärraum in Verbindung steht, und daß die Membranen des T-Systems kontinuierlich in die Zellenmembran übergehen.

Endo (1964, 1966), Huxley H.E. (1964) und Page (1964) demonstrierten, daß große Moleküle aus dem die Muskelfaser umgebenden Medium in das Lumen der transversalen Tubuli einzudringen vermögen. Peachey (1965) hat mit Hilfe von elektronenoptischen Aufnahmen vom Muskulus Sartorius am Frosch versucht die Volumina und Oberflächenanteile der verschiedenen Komponenten der sarkoplasmatischen Membranen zu schätzen. Nach seiner dreidimensionalen Rekonstruktion besteht das T-System aus einem sich verzweigenden Gitter in der Ebene der Z-Linie. Er nimmt an, daß dieses Gitter ohne Unterbrechung alle Myofibrillen vollständig umschließt.

Auf beiden Seiten eines T-Tubulus kommen angeblich die sackähnlichen Terminal Cisternae des Sarkoplasmatischen Retikulums mit ihren abgeflachten Enden zu liegen. Ein T-Tubulus mit den beiden angrenzenden Terminal Cisternae stellt also die Triade dar. Nach Peachey verläuft das sarkoplasmatische Retikulum longitudinal zwischen den Myofibrillen entlang; in der Umgebung des lateralen A-Bandes erscheint es tubulär im Gegensatz zu der bläschenartigen Struktur in der Gegend der am Ende eines Sarkomers liegenden Terminalcisterne.

Wegen der wahrscheinlichen Bedeutung für die elektromechanische Kopplung untersuchte Clara Armstrong (1968) die Struktur, wo sich das sarkoplasmatische Retikulum

und das T-System einander annähern. Sie fand, daß sich die Membranen der Terminalcisternen im Abstand von 310-330 Å periodisch der Tubulusemembran annähern.

Der maximale Zwischenraum zwischen den beiden Membranen an solchen Stellen wurde mit 110-130 Å angegeben.

Funktion des T-Systems: Huxley und Taylor (1958)

schlugen vor, daß der Weg des Erregungsprozesses, der die Myofibrillen im Inneren einer Muskelfaser aktiviert, von der Oberflächenmembran entlang dem zentralen Element der Tetraden verläuft, also entlang den T-Tubuli. Diese Theorie ist heute allgemein anerkannt.

Die Experimente von Huxley & Taylor (1958) am Froschmuskel und von Huxley & Straub (1958) am Eidechsenmuskel zeigten, daß lokale Stromstöße an bestimmten Stellen einer Muskelfaser lokale Kontraktionen auslösen konnten. Dies funktionierte nur wenn die Micropipette, durch die der Strom übergeleitet wurde, genau an der Z-Linie lokalisiert war. Die so ausgelösten Kontraktionen waren auf die beiden Halbsarkomere auf beiden Seiten der betroffenen Z-Linie begrenzt. Die Tatsache, daß die Kontraktion immer tiefere Schichten der Faser betraf, je stärker der Stromimpuls gewählt wurde, daß aber immer nur die beiden angrenzenden Halbsarkomere betroffen waren, weist auf die Passivität der Erregungsleitung nach innen hin. Am Eidechsenmuskel konnten Kontraktionen nur

dann erzeugt werden, wenn die Strompipette sich am Übergang vom A- zum I-Band befand. Die Tatsache, daß die für eine Aktivierung zuständigen Bezirke beim Frosch an der Z-Linie und bei der Eidechse am A-I-Übergang liegen, zusammen mit dem Befund, daß am Frosch sich die Tetraden an der Z-Linie (Peachey 1965) und bei der Eidechse am A-I-Übergang (Robertson 1956) befinden, machte es sehr wahrscheinlich, daß die Tetrade mit der Einwärtsleitung der Erregung etwas zu tun haben mußte. Die Frage ob die Erregungsleitung entlang dem T-Tubuli ein passiver oder regenerativer Prozess ist ähnlich dem Aktionspotential ist Gegenstand vieler neuerer Untersuchungen (Huxley & Taylor (1958); Gonzales-Serratos (1971)), aber eine allgemein akzeptierte Antwort konnte sich bis jetzt noch nicht durchsetzen. Eine aktive Erregungsleitung gilt als wahrscheinlich.

Die Kapazität zwischen dem Zytoplasma und dem die Zelle umgebenden Medium ist in quergestreiften Muskeln unverhältnismäßig hoch im Vergleich mit nicht myelinisierten Nervenfasern oder anderen Zelltypen. Seit einiger Zeit ist klar, daß dies auf die Membranen des T-Systems zurückzuführen ist, welche eine zur Oberflächenmembran parallel geschaltete Kapazität darstellten (Falk & Fatt 1964, Schneider 1970, Nakajima & Hodgkin 1970). Diese Auffassung wurde durch die Beobachtung bestätigt, daß die totale Kapazität sinkt, wenn die T-Tubuli durch osmotische Behandlung in ihrer Funktion gestört werden (Gage & Eisenberg 1967).

Zusammenhänge zwischen früher Nachdepolarisation,
Glycerinbehandlung, T-System und elektromechanischer
Kopplung

Die späte Nachdepolarisation wird mit langsamen Veränderungen der Kaliumkonzentrationen im Lumen der T-Tubuli erklärt. Wegen der im Vergleich zum Volumen des Tubuluslumens sehr großen Oberfläche der Tubulismembran kann ein relativ kleiner Stromfluß zu beachtlichen Veränderungen der Ionenkonzentration im Tubuluslumen führen. Eine Akkumulation von K^+ -Ionen während einer Impulssalve und anschließendes Herausdiffundieren in den Extrazellularraum macht man für das langsame Absinken des Membranpotentials nach mehreren Aktionspotentialen, also für die späte Nachdepolarisation, verantwortlich (Freygang et al 1964).

In Analogie hierzu kehrt das Membranpotential nach künstlicher Hyperpolarisation nicht mit normaler Zeitkonstante zum Ausgangspotential zurück, sondern erreicht dieses erst wesentlich später als erwartet; eine Verringerung der tubulären K^+ -Konzentration durch den hyperpolarisierenden Strom ist die Ursache hierfür.

Wie Adrian und Freygang (1962) zeigten, kann eine K^+ -Akkumulation die frühe Nachdepolarisation nicht erklären: Sie errechneten, daß das K -Äquilibriumspotential sich nach einem Aktionspotential durch Ansammlung von K^+ -Ionen in

den Tubuli höchstens um ca. 10 mV ändern könnte. Die Größe der frühen Nachdepolarisation dürfte aber wegen der K^+ -gängigen Öffnungen der Tubuli sowie wegen der Auswirkungen des Cl^- -Potentials über der Fasenoberfläche nicht mehr als die Hälfte dieses Wertes betragen. Die frühe Nachdepolarisation beträgt aber tatsächlich oft weit mehr als 20 mV. Darüberhinaus ist die frühe Nachdepolarisation im Skelettmuskel nach mehreren im Abstand von 4 - 6 msec. gegebenen Impulsen kaum größer als die frühe Nachdepolarisation nach einem einzigen Impuls (Buchthal & Sten-Knudsen 1959). Würde jeder Impuls die tubuläre K^+ -Konzentration um den gleichen Betrag erhöhen (1 - 2,4 mV/Impuls) müßte sich die frühe Nachdepolarisation nach zwei Impulsen um 50% erhöhen, was nicht der Fall ist.

Glycerinbehandlung: Bringt man eine Muskelfaser in hypertone Lösung, so verliert sie nach kurzer Zeit die Fähigkeit zur Kontraktion (Hodgkin & Horowicz 1957). Elektrische Erregbarkeit und Aktionspotential werden dadurch nicht beeinflusst. Tauscht man anschließend das Ringerbad gegen eine Ringerlösung, die ca. 420 mM Glycerin enthält, ohne allerdings die Hypertonizität zu verändern, so erholt sich der Muskel nach 6 - 10 Minuten; die Kontraktionskraft erreicht dann wieder bis zu 70% des Wertes des unbehandelten Muskels (Fujino, Suzuki Yamaguchi 1961).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Verminderung der Kontraktionskraft in hypertoner Lösung nicht auf einer Zerstörung des kontraktile Apparates, sondern auf einer Unterbrechung der Erregungsleitung von der Oberfläche zum Zellinnern beruht.

Bringt man einen in Glycerin-Ringer eingelegten Muskel in normale Ringerlösung (= Glycerinbehandlung, vgl. entsprechendes Kapitel bei Methoden) verliert er sofort und irreversibel die Fähigkeit zur Kontraktion bzw. Spannung zu entwickeln. Koffein-Kontraktionen (siehe unten) sind jedoch nach wie vor auslösbar (J.N. Howell & D.J. Jenden 1967). Daraus folgt wiederum, daß Glycerin lediglich die Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion unterbricht. Elektronenoptische Aufnahmen zeigen, daß bei glycerinbehandelten Muskelfasern das zentrale Element der Triaden zerstört ist. An seiner Stelle sind nur noch ungeordnete Vesikel zu erkennen. Die Störung der Funktion des mit Glycerin behandelten Skelettmuskels geht also mit einer das T-System betreffenden morphologischen Veränderung einher. Im Gegensatz zu Ringerlösungen, die durch impermeable Teilchen wie Glucose, Sucrose oder NaCl hypertonic

=====

Koffein-Kontraktionen

Koffein ist in der Lage aus intrazellulären Speichern im Skelettmuskel Ca^{++} freizusetzen; es lassen sich daher durch Koffein Kontraktionen auslösen (Binachi & Shanes 1959, Herz & Weber 1965, Carvalho & Leo 1967). Meines Wissens ist es nicht klar, ob Koffein direkt über das Sarkoplasmatische Retikulum oder indirekt über einen Effekt auf die T-Tubuli wirkt. Würde der Koffeineffekt von intakten Triaden bestehend aus zentralen T-Tubulus und eng anliegender Terminalzisterne abhängen, so wäre zu erwarten, daß die Intensität der Reaktion auf Koffein in glycerinbehandelten Fasern abnehmen wenn nicht gar ausbleiben würde; da dies nicht der Fall ist, scheint Koffein direkt auf die SR-Membranen einzuwirken.

gemacht wurden, blockiert mit permeablen Teilchen wie Glycerin, Äthylen-Glycol oder Propylen-Glycol hypertotonische Ringerlösung nicht die synaptische Überleitung obwohl beide Arten hypertotonische Ringer die elektromechanische Kopplung hemmen. Glycerin-Ringer wurde deshalb für Untersuchungen der Endplattenmembran benutzt (Deguchi & Naharashi 1971; Maeno, Edwards & Hashimura 1971). Perfundiert man eine mit Glycerin behandelte Muskelfaser wieder mit normaler Ringerlösung, so kann das vesikulierte T-System nicht mehr von elektronenabsorbierenden Markierungsstoffen wie Meerettich-Peroxidase (Graham, Karnovsky 1966) (Eisenberg & Eisenberg 1968) oder Ferritin (Krolenko 1969) erreicht werden, was vermuten läßt, daß das T-System nicht mehr mit dem extrazellulären Raum in Verbindung steht.

Carlo Caputo (1968) zeigte, daß bei Muskeln in hypertoner Lösung die Kontraktionskraft nachläßt und die Fasern vorübergehend bis auf 65% der Ausgangsgröße schrumpften. Nach Rückkehr in Normal-Ringer erholten sich die Fasern, die in mit NaCl hypertoner Lösung waren am schnellsten, diejenigen, die in mit Glycerin hypertoner Lösung waren am langsamsten. Besonders von glycerinbehandelten Fasern wird berichtet, daß sie in Normal-Ringer vorübergehend stark anschwellen, wie zu erwarten, wenn Glycerin die Membran passiert und daß außerdem in glycerinbehandelten Fasern die frühe Nachdepolarisation verschwindet.

Hypotone Lösung hat in Bezug auf Kontraktionskraft die gleiche Wirkung wie hypertone Ringer. Aber sowohl Volumenänderung als auch Verlust von Kontraktionskraft sind nach Rückkehr der Muskelfasern von hypotoner Ringer in Normal-Ringer rasch reversibel. Diese Tatsache beweist, daß weder das Schrumpfen noch das Schwellen der Glycerinfasern die Ursache ist für den Verlust der Fähigkeit, sich zu kontrahieren.

Nach Hanson und Person (1971) verschwindet in glycerin-behandelten Muskelfasern die frühe Nachdepolarisation und die Kontraktionsfähigkeit mit dem gleichen zeitlichen Verlauf. Dies steht im Widerspruch zu einer Arbeit von Zacher (Zacher et al 1972); diese bestreitet einen Zusammenhang zwischen Verlust der Kontraktionsfähigkeit bevor eine Veränderung der frühen Nachdepolarisation auftritt. Weiter wird hier gesagt, daß erneute Immersion eines glycerinbehandelten Muskels in Glycerin-Ringer die Erholung des Muskels mit einem Verschwinden der elektronenoptisch sichtbaren Vesikel einhergeht. Dies ist schwer mit Howell (1969) in Einklang zu bringen, der von einer Zerstörung bzw. Zerreißung des zentralen Elementes der Triaden spricht: Die Vesikel würden sich zwar verkleinern, aber die Kontinuität des T-Systems könnte nicht wieder hergestellt werden.

Nach Gage und Eisenberg (1969) zeigen glycerinbehandelte Muskelfasern keine frühe Nachdepolarisation, sondern stattdessen sogar eine leichte Nachhyperpolarisation. Diese verstärkt sich bei weiterer Depolarisation des Ausgangsmembran-

potentials. Auf der anderen Seite konnte durch Hyperpolarisation des Membranpotentials die Nachhyperpolarisation in eine Nachdepolarisation, also in eine frühe Nachdepolarisation, umgewandelt werden. Das Nachpotentialniveau scheint also nahe dem in glycerinbehandelten Fasern verminderten Ruhepotential zu liegen; eine einfache Erklärung für das Verschwinden der frühen Nachdepolarisation.

Kurze Zeit danach entdeckte Henderson (1970), daß wenn die Glycerinbehandlung bei 8°C bzw. 29°C durchgeführt wird, die frühe Nachdepolarisation nicht verringert ist. Und auch bei Raumtemperatur sei die frühe Nachdepolarisation nach genügend langer Äquilibrierungszeit in normal-Ringer fast vollständig wiederhergestellt. Daraus ist zu schließen, daß falls die Erscheinung der frühen Nachdepolarisation überhaupt mit dem Ruhepotential etwas zu tun hat, es jedoch keineswegs nur von letzterem abhängt; in der Konsequenz ein krasser Widerspruch zu Gage und Eisenberg (siehe oben). Daraus ist zu sagen, daß Henderson die Effektivität seiner Glycerinbehandlung nur durch mikroskopische Beobachtung des Muskels kontrollierte; er bestimmte nicht die Membrankapazität seiner Muskelfasern. Ein kritisches Auge sieht hierin ein Argument an der Richtigkeit Hendersons Ergebnisse zu zweifeln.

Kürzlich erschien ein Bericht über Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Änderungen des Volumens, der Kontraktionsfähigkeit sowie der Membrankapazität einzelner Froschskelettmuskelfasern (Dulhunty & Gage 1973). Daraus geht hervor, daß die Verminderung der Kapazität in glyceringeladenen Fasern nach Rückkehr in normale Ringerlösung langsamer ist als Änderungen des Faservolumens, und daß die beiden Größen nicht voneinander abhängen. Dagegen zeigt das anfängliche Schwellen in normaler Ringerlösung den gleichen Zeitverlauf wie das Versagen der Erregbarkeit; ein ursächlicher Zusammenhang erscheint also wahrscheinlich. Ein weiterer wichtiger Punkt dieser Arbeit ist, daß die Glycerinimmersionszeiten, die notwendig sind zur Unterbrechung der elektromechanischen Kopplung bzw. zur Isolierung des T-Systems vom Extrazellulärraum verschieden sind, was zeigt, daß dies zwei verschiedene Wirkungen der Glycerinbehandlung sind, und daß Ersteres nicht auf dem Zweiten beruht.

Ebenso gelang es Dulhunty & Gage (1973) die Wirkung der Glycerinbehandlung auf die Kontraktionsfähigkeit von der Destruktion der Tubuli zu trennen. Durch eine relativ milde Glycerinbehandlung brachten sie die Kontraktionen zum Verschwinden, während die Tubuli intakt blieben. Auch Chandler (et al 1976) fanden eine Reduktion der Bewegung elektrischer Ladungen in der Membran um 80%, während die Tubuli nur um 40% zerstört wurden. Auch das

spricht dafür, daß die Verhinderung der Kontraktion nicht nur auf die Unterbrechung des tubulären Systems zurückzuführen ist, und daß Glycerin noch mindestens eine weitere Wirkung auf die Membran der Muskelzelle hat, nämlich die Reduktion der Verschiebung von elektrisch geladenen Partikeln in der Membran.

Auf der Suche nach dem Ursprung der frühen Nachdepolarisation hat man versucht letzteres mit metabolischen Prozessen in Zusammenhang zu bringen. Anstoß dazu gab die Tatsache der Temperaturabhängigkeit der frühen Nachdepolarisation. Man benutzte dazu metabolische Inhibitoren wie DNP oder Jodacetat um die Produktion von energiereichen Phosphaten zu stoppen (Macfarlaine/Mearns 1958). Die Wirkungen dieser Drogen sind vielfältig; und man weiß, daß wenn ein Produktionsweg von ATP gehemmt ist, andere Wege diese Minderproduktion kompensieren können. Außerdem können diese Drogen durch Veränderungen der Membran sekundär natürlich auch die frühe Nachdepolarisation beeinflussen. Solche Experimente versprechen also meiner Meinung nach keine schlüssigen Resultate.

Neben den in diesem Kapitel erwähnten Arbeiten gibt es noch eine Reihe weiterer Autoren, die sich mit der frühen Nachdepolarisation beschäftigt haben. Leider unterschieden viele nicht exakt zwischen Änderungen der Amplitude der frühen Nachdepolarisation, die durch Änderung des Membranpotentials verursacht wurden und jenen Veränderungen, die durch Verschiebung des Umkehrpotentials bedingt sind. Dies macht es schwer, viele dieser Arbeiten auszuwerten.

Zur Veranschaulichung seien hier zwei elektronenoptische Aufnahmen von intakten und zerstörten Triaden beigelegt.

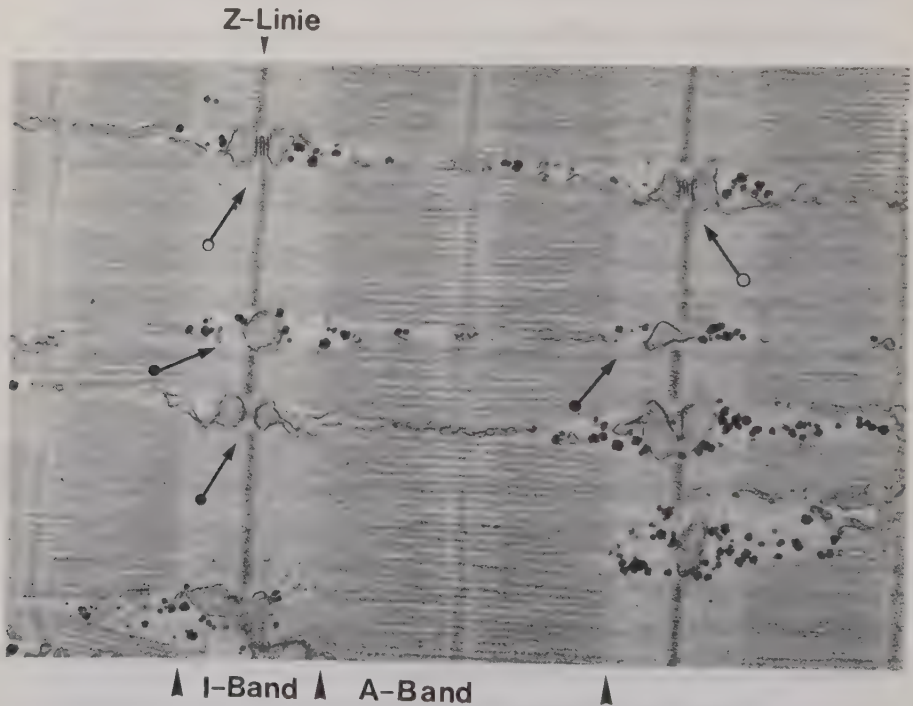


Abb. 2: Elektronenoptische Aufnahme einer Froschmuskelfaser.

Bei ○ → intakte Triaden

Bei ● → zerstörte Triaden

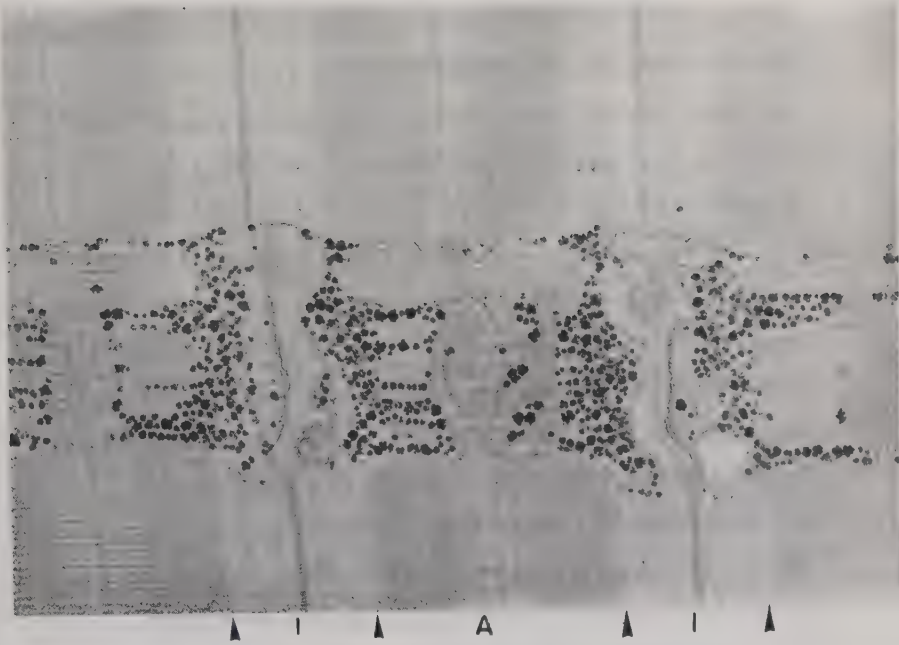


Abb. 3: Zerstörte Triaden einer Froschmuskelfaser
(Elektronenoptische Aufnahme)
I=I-Band; A=A-Band.

Methoden

Versuchsmaterial und Seziertechnik

Für alle beschriebenen Experimente wurden Fasern vom Musculus Sartorius aus Fröschen der Spezies Rana Pipiens benutzt.

Die Frösche wurden in einem Wasserbecken gehalten und unmittelbar vor Beginn eines Versuchs durch mechanische Zerstörung des spinalen und zentralen Nervensystems getötet. Nach Häutung der unteren Extremitäten wurde ein Faden um die distale Sehne gebunden und von da beginnend wurde der Muskel sorgfältig herausseziert, wobei so viel wie möglich Bindegewebe entfernt wurde, um später bessere Perfusion des Muskels zu ermöglichen. Am distalen Ende wurde durch Schnitt in tiefere Muskelschichten und Durchtrennung des Beckenknochens die natürliche Fixation des Muskels bewahrt, die dann später zur Befestigung in der Versuchskammer diente. Während dieser ganzen Prozedur, die nicht mehr als 10 min. dauerte, wurde die Oberfläche des Muskels ständig in Ringerlösung benetzt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Das Präparat wurde dann in der mit Ringerlösung gefüllten Versuchskammer zwischen zwei am Boden verankerten Nadelspitzen befestigt; dabei wurde es minimal gedehnt um die Kontraktionskraft zu vermindern.

Aufbau zur intrazellulären Aktionspotentialableitung und Kabelanalyse

Versuchskammer

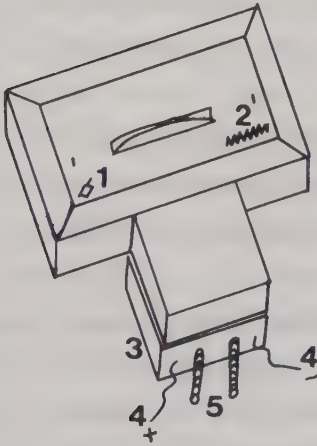


Abb. 4 Versuchskammer
1: Temperaturfühler
2: Referenzelektrode
3: Peltier-Element
4: elektr. Anschluß zum
Temperaturregler
5: Anschluß zur Wasser-
leitung

Die Versuchskammer wurde speziell für diesen Zweck von mir gebaut. Sie besteht aus zwei Teilen:

1) Der Boden wurde aus Plexiglas hergestellt. Eine Erhebung in der Mitte mit den Maßen eines M.Sart. dient als Podest für das Muskelpräparat; dieses ermöglicht es die Befestigung der Sehnen tiefer zu legen als den Muskel selbst, was zur besseren Fixation beiträgt. Zwei Öffnungen im Boden am Rande der Kammer dienen der Einführung eines Temperaturfühlers und der Referenzelektrode.

2) Die Kammerwände wurden der besseren Wärmeleitung wegen aus Metall angefertigt. Dieses wurde mit Teflon überzogen, einer inerten Verbindung zur Verhinderung etwaiger Reaktionen des Materials mit Bestandteilen der verschiedenen Ringerlösungen. Der Metallrahmen wurde auf einer Seite erweitert, um genügend Kontaktfläche zu bilden mit einem Peltier-Element zur Kühlung bzw. Erwärmung der Kammer.

Um einen schnellen Lösungswechsel zu ermöglichen wurde eine Absaugvorrichtung bereitgehalten mit deren Hilfe das Ringerbad innerhalb von 20 sec. gegen ein anderes ausgetauscht werden konnte.

Temperaturregler Um die Temperatur der Ringerlösung in der Versuchskammer konstant zu halten, wurde ein automatischer Temperaturregler gebaut; dessen einzelne Elemente sind in Abbildung 5 skizziert:

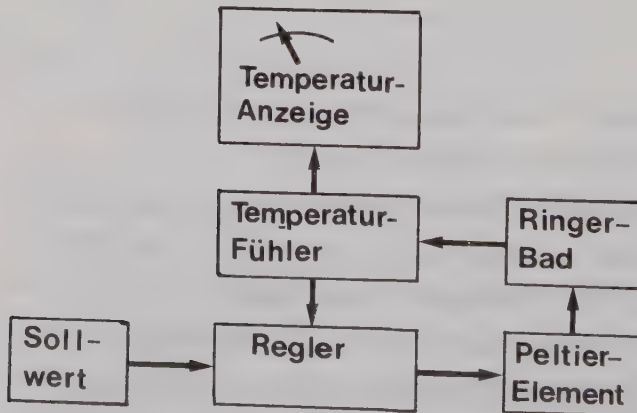


Abb. 5: Regelkreis zur Konstanthaltung der Temperatur des Ringerbades

Die wichtigsten Bestandteile des Temperaturreglers seien im Folgenden kurz erläutert:

Temperaturfühler: Der Temperaturfühler, der einen Durchmesser von nur 1 mm hat, wurde in die Spitze einer abgesägten Kanüle eingebaut, welche durch den Boden der Versuchskammer in die Ringerlösung taucht. Der Temperaturfühler ändert seinen elektrischen Widerstand in Abhängigkeit von der Temperatur der Ringerlösung; die Stärke des Stromflusses durch den Temperaturfühler wird auf einem Amperemeter, der mit einem Telethermometer geeicht wurde, angezeigt.

Peltier-Element: Das Peltier-Element besteht aus vielen hintereinander geschalteten Thermoelementen, deren warme bzw. kalte Punkte alle auf der gleichen Seite liegen. Eine Seite hat dabei engen Kontakt mit dem Metallrahmen der Versuchskammer; die andere Seite steht mit einem Metallgehäuse in Berührung, durch das Leitungswasser strömt, und das als Wärmeaustauscher fungiert.

Regler: Der Regler vergleicht den Stromfluß durch den Temperaturfühler mit dem eingestellten Sollwert und versorgt das Peltier-Element mit der entsprechenden Energie, die notwendig ist, die gewünschte Temperatur zu erreichen.

Der Feedback-Regler wurde von mir nach einem Vorschlag von Dr. Francisco Bezanilla gebaut.

(Vgl. Schaltplan in Abbildung 6)

Erzeugung eines Stromimpulses von konstanter Größe

Zur Durchführung der Kabelanalyse ist es notwendig, der Muskelfaser Stromimpulse aufzuzwingen von konstanter Dauer und Größe. Es ist deshalb notwendig, Stromimpulse zu erzeugen, deren Stärke sich selbst bei Widerstandsänderungen im Schaltkreis so gut wie nicht verändert. Hierzu wurde unten abgebildetes Schaltschema verwirklicht.

Eine der hervorstechenden Eigenschaften der benutzten Verstärker ist es, nicht den geringsten Spannungsunterschied zwischen den beiden Eingängen aufkommen zu lassen. Angenommen dem oberen der beiden Verstärker (1026) wird ein Rechteckimpuls zuge-

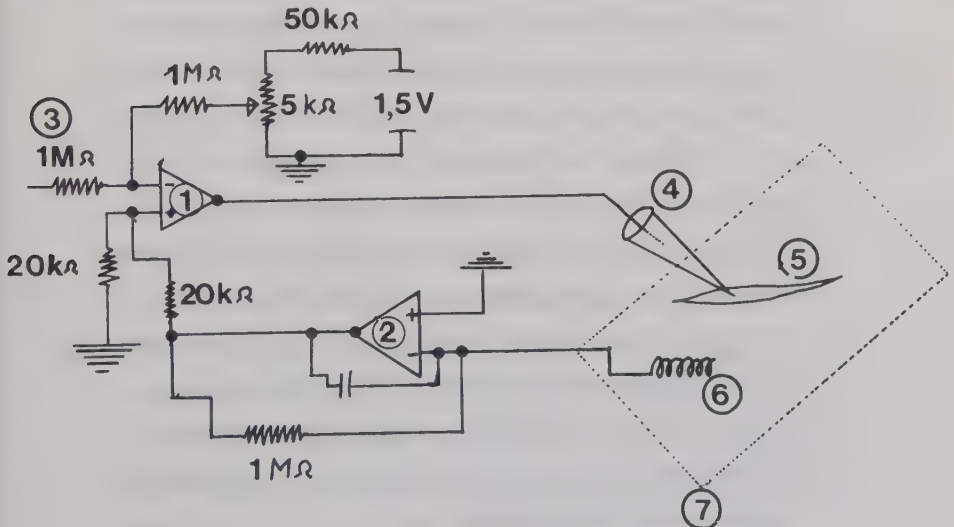


Abb. 7: Schaltplan zur Erzeugung eines konstanten Stromimpulses. 1: FET-Operationsverstärker 2: FET-Operationsverstärker 3: Eingang 4: Mikroelektrode 5: Muskelfaser 6: Referenzelektrode 7: Versuchskammer

führt, so verursacht der Verstärker mit minimaler Reaktionszeit für die Dauer des Impulses einen Strom, der geeignet ist die Spannungsdifferenz auszugleichen. Es kommt also zum Stromfluß durch die Mikroelektrode, die Muskelfasermembran, die Ringerlösung, die zweite Elektrode, den 1Mohm großen Widerstand über dem strommessenden Verstärker, und die beiden in Serie geschalteten 20 kohm großen Widerstände. Dabei sorgt der obere (1026) Verstärker dafür, daß sich während des Pulses die Stromstärke nicht verändert; der untere (1011) fungiert als virtuelle Erde für die Ringerlösung. Die Ausgangsspannung dieses Verstärkers, welche auf dem Kathodenstrahloszillograph parallel zur Membranauslenkung abgebildet wird, dividiert durch den 1 Mohm-Widerstand zwischen Ausgang und virtueller Erde ergibt den Strom der durch die Muskelfaser fließt. Durch Verbidnung des Eingangs des oberen Verstärkers (1026) mit einer Batterie über einen Spannungsmesser war es auch möglich, der Muskelfaser einen kontinuierlichen Strom variabler Größe aufzuzwingen, um das Ruhemembranpotential zu manipulieren. Die Form des Aktionspotentials erfährt dadurch keine Veränderung, da die Stromstärke von Änderungen der Membran nicht beeinflußbar ist.

Externe Stimulierung des Muskels Der von einem Stimuliergerät stammende Stimulus wird über chlorierte Silberdrähte auf den Muskel übertragen. Die Drähte sind zugespitzt und sehr eng nebeneinander auf einem Mikromanipulator montiert, was es ermöglicht, immer nur einen kleinen Bereich des Muskels zu stimulieren. Um eine Streuung des Stimulierstromes zu vermeiden, sind die Drähte bis zur äußersten Spitze isoliert.

Mikroelektroden Die Mikroelektroden wurden mit einem automatischen senkrechten Pipettenzieher (David Kopf Instruments) hergestellt. Dazu wurde jeweils ein ca. 8 cm langes Pyrex-Röhrchen an einem Ende fixiert und am anderen Ende mit einem Solenoid verbunden. Die Mitte des Röhrchens wird dann durch eine Drahtspule, durch die ein in der Stärke verstellbarer Strom geleitet wird, erhitzt; sobald die von der Spule umgebene Stelle anfängt zu schmelzen und das Röhrchen durch das Eigengewicht des Solenoids minimal auseinandergezogen wird, wird durch einen Mikroschalter das Solenoid angestellt, welches dann das Röhrchen mit konstanter Geschwindigkeit auseinanderzieht. Diese Zuggeschwindigkeit sowie der Heizstrom können beliebig eingestellt werden; so ist es möglich Mikroelektroden mit beliebigem Spitzendurchmesser herzustellen.

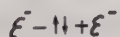
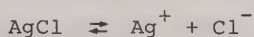
Die Mikropipetten wurden dann mit den Spitzen nach unten in kochendes Methanol getaucht; bei unteratmosphärischem Druck wurden die Pipetten dann solange gekocht, bis sie vollkommen mit Methanol gefüllt waren. Anschließend wurden sie in destilliertes Wasser gegeben, wo das Methanol sofort herausdiffundierte. (Wegen der größeren Oberflächenspannung diffundiert Wasser nicht direkt in luftgefüllten Kapillaren.) Die wassergefüllten Mikropipetten wurden dann in 3molare KCl getaucht; dieses äquilibrierte mit dem Wasser in den Pipetten.

Die elektrischen Verbindungen zu den Mikropipetten wurden mit isolierten Kabeln hergestellt; diese wurden mit einem kurzen dünnen (0,05 mm) chlorierten Silberdraht verlötet, welcher in die Mikropipetten hineinreichte. Die Gründe für diesen relativ aufwendigen Aufbau der Elektroden seien im Folgenden kurz erläutert:

Bei der Ableitung elektrischer Signale aus einer Muskelfaser besteht das Hauptproblem darin, daß die Elektrizitätsleitung in den metallischen Leitern der angeschlossenen Geräte eine Elektronenleitung ist, die in dem Myoplasma dagegen eine Ionenleitung.

Eine in der Mikropipette hängender Silberdraht stellt mit der KCl-Lösung ein Halbelement dar. Zwar kann bei Stromfluß das Metallion (Ag^+) durch Entladung auf der Kathode als reines Metall abgeschieden werden, oder bei umgekehrter Stromrichtung das Metall in Lösung gehen,

Anionen jedoch verändern bei der Entladung die Zusammensetzung des Elektrolyten vor der Anode und damit die Spannung des Halbelementes. Durch Chlorierung des Silberdrahtes kann die ganze Anordnung für Kationen und Anionen reversibel gemacht werden, d.h. die Elektrode wird dadurch unpolarisierbar, sie ändert bei Stromfluß nicht ihre Eigenschaften:



Ag

An der Grenzfläche zwischen zwei verschiedenen Lösungen entsteht durch verschieden schnelle Diffusion verschiedenen geladener Teilchen eine Spannungsdifferenz zwischen beiden Lösungen; ist die Mikropipette nun mit dreimolarer KCl-Lösung gefüllt, so verhindert das die Bildung eines Diffusionspotentials, da gegenüber der starken Diffusion von K^+ und Cl^- die Bewegung anderer Ionen vernachlässigt werden kann; durch die Diffusion von K^+ und Cl^- entsteht dabei keine Spannung, da beide den gleichen Diffusionskoeffizienten haben.

Das von der Spitze der Mikropipette in die Muskelfaser diffundierende KCl reicht nicht aus, die intrazellulären Ionenkonzentrationen in einem Maße zu verändern, das die beschriebenen Experimente beeinflussen könnte (Philbrick/Nexus).

Der Vorverstärker Das Membranpotential wurde gemessen als Spannungs-Differenz zwischen der intrazellulären Mikropipette und einer am Ringerbad hängenden Referenzelektrode. Dieses Potential wurde zunächst vorverstärkt, um dann auf einem Kathodenstrahl-Oscilloskop zur Darstellung gebracht zu werden. Als Vorverstärker diente ein Bioelectric NF 1.

Um die Kapazität des Kabels so niedrig wie möglich zu halten, wurde der Vorverstärker direkt neben der Versuchskammer aufgehängt; das Zuführungskabel brauchte dann nur sehr kurz zu sein.

Je höher der Widerstand der Elektrode und die Kapazitäten des Eingangs des Vorverstärkers (VV) der elektrischen Leitungen und der Mikroelektroden sind, das heißt, je höher die Zeitkonstante des elektrischen Systems ($R \times C$) ist, um so mehr wird die Form der abgeleiteten Potentialänderungen verzerrt. Um eine solche Verzerrung von Signalen zu verhindern, besitzt der benutzte Vorverstärker eine Eingangskapazität-Neutralisation. Das diesem zu Grunde liegende Prinzip beruht auf der Tatsache, daß zwei Kondensatoren mit gegensätzlicher Polung, wenn sie parallel geschaltet werden, sich neutralisieren. Das wesentliche Element der Eingangskapazitäts-Neutralisation ist also die Bildung einer der Eingangskapazität entgegengerichteten Kapazität an den Eingangspunkten des VV. Der Eingangswiderstand des VV liegt mit 10^{11} ohm wesentlich über dem Widerstand der Mikroelektrode, der gewöhn-

lich um 5Mohm betrug. Der Eingangstrom des VV ist daher so gering, daß er sich für die Muskelfaser wohl nicht bemerkbar macht.

Der Vorverstärker ermöglichte es den Widerstand der Mikroelektrode auch während eines Experimentes zu bestimmen. Der dazu eingebaute Schaltkreis bestand im Prinzip aus einem Spannungsteiler; aus dem Verhältnis einer intern angelegten Spannung zu der über der Elektrode gemessenen Spannung konnte der Elektrodenwiderstand kalkuliert werden.

Da die Pipettenspitze durch evtl. Bewegungen des Muskels sehr leicht abgebrochen werden kann, ist es sehr angenehm dies durch Messung des Elektrodenwiderstandes kontrollieren zu können ohne die Elektrode aus dem Präparat entfernen zu müssen.

An einem Ausgang des Vorverstärkers wurde ein Wechselstromlautsprecher angeschlossen. Auf diese Weise konnte jede abrupte Potentialänderung an der Spitze der Elektrode akustisch wahrgenommen werden; dies ermöglichte es, die Mikropipetten beim Eindringen in die Zelle zu beobachten, was die Bestimmung der genauen Lokalisation der Pipettenspitze erleichterte und präzisierte.

Der andere Ausgang des Vorverstärkers war mit einem Voltmeter (Schaltschema Abbildung 9) verbunden. Ein dritter Ausgang verband den Vorverstärker mit dem Oszilloskop.

Voltmeter Entsprechend der Verstärkung des Vorverstärkers um den Faktor zwei wurde zwischen Ausgang des Vorverstärkers und Eingang zum Voltmeter eine Verstärkung um den Faktor 1/2 eingebaut.

Der Voltmeter wurde nach folgendem Schaltplan gebaut:

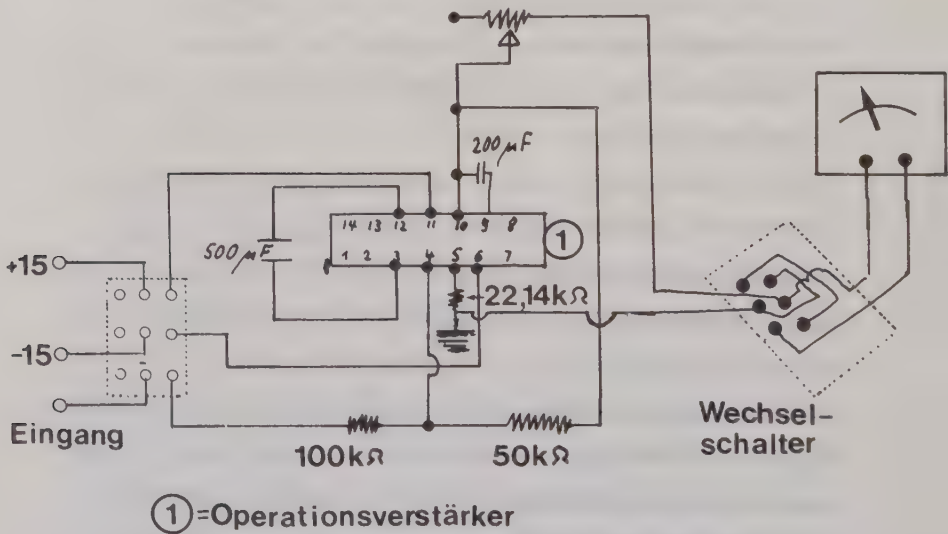


Abb. 8: Schaltplan des Voltmeters

Oszilloskop Um das Membranpotential zu beobachten wurde ein Doppelstrahl-Oszilloskop benutzt.

Wann immer mit dem Stimuliergerät gearbeitet wurde, wurde das Oszilloskop von diesem getriggert.

Kamera Zu Aufzeichnungszwecken wurde eine Kamera vor dem Bildschirm Oszilloskop montiert. Das obere Drittel des Films wurde immer von einer beleuchteten Uhr und einem Zählwerk belichtet zur späteren Identifikation der Bilder.

Durchführung eines typischen Experimentes Zunächst wurden die beiden Mikropipetten und die externen Stimulierelektroden mit Hilfe von Mikromanipulatoren in der Versuchskammer dem Muskel genähert. Nach Ausbalancierung des Vorverstärkers wurde dann die Spannungselektrode in eine Muskelfaser eingeführt (dabei wurden randständige oberflächliche Fasern bevorzugt). Sodann wurden die Stimulierelektroden auf die betreffende Muskelfaser eingestellt. Der erste Stimulus wurde immer sehr klein gehalten und dann stufenweise erhöht, bis das Schwellenpotential gerade erreicht wurde, um den Muskel nicht mehr als unbedingt notwendig zu reizen. Nach Stimulierung und Aufzeichnung von Aktionspotentialen wurden die Stimulierelektroden entfernt und die Stromelektrode wurde mit eingeschaltetem konstantem Streuimpuls möglichst nahe der Spannungselektrode in die Faser eingeführt, wobei der Lautsprecher das Durchdringen der Membran und das Eindringen in die gleiche Muskelfaser, in der sich die Spannungselektrode schon befand, signalisierte. Die Membranauslenkungen bei verschiedenen Abständen der beiden Elektroden voneinander wurden mit der Kamera festgehalten. Änderte sich im Laufe dieser Prozedur das Ruhepotentialmembran geringfügig, so wurde durch Verabreichung

eines konstanten Dauerstromes zusätzlich zu den Stromimpulsen das ursprüngliche Ruhepotential wiederhergestellt. Nach Beendigung der elektrischen Messungen wurde der Faserdurchmesser mit einem Wasserimmersionsobjektiv bestimmt. Bewegen der Faser mit den sich noch in der Faser befindlichen Mikropipetten erleichterte es meist die Ränder der Faser zu lokalisieren.

Die Glycerinbehandlung Unter einer Glycerinbehandlung, wie sie in der Einleitung des öfteren erwähnt wird, versteht man die Immersion eines Muskels bzw. einer einzelnen Muskelfaser in hypertonem Glycerinringer (Zusammensetzung siehe Tabelle Seite 43) für 50 - 60 Minuten und anschließen- des Austauschen der Glycerinlösung gegen normalen Ringer. Dabei kommt es oft zu einem leichten Absinken des Ruhemembranpotentials. Verschiedene Autoren haben nach Methoden gesucht dies zu vermeiden. Am wirkungsvollsten schien es zu sein den Muskel nach der Immersion in Gly-R zunächst einer "Waschlösung" auszusetzen, mit im Vergleich zu Normalringer erhöhtem Ca^{++} und Mg^{+} -Gehalt (Eisenberg, Howell & Vaughan 71).

Diese Waschlösung (siehe Tabelle) wurde ausprobiert; es konnte aber kein nennenswerter Einfluß auf das Ruhepotential festgestellt werden. Durch Verzögerung des Versuchsablaufs machte sich die Anwendung der Waschlösung nur negativ bemerkbar, weshalb sie nicht angewandt wurde.

Die Effektivität der Glycerinbehandlung wurde durch Bestimmung der Oberflächenkapazität kontrolliert (Gage & Eisenberg 1969). Die theoretischen Grundlagen hierzu sind im Anhang beschrieben. Außerdem wurden alle Präparate unter starker Vergrößerung auf eventuelle eng begrenzte Kontraktionen hin untersucht, die anzeigen würden, daß bei diesen Fasern die Glycerinbehandlung nicht in der gewohnten Weise wirksam war. Um sicher zu sein, daß nur gut perfundierte Fasern untersucht wurden, wurden nur am Rande gelegene oberflächliche Fasern examiniert.

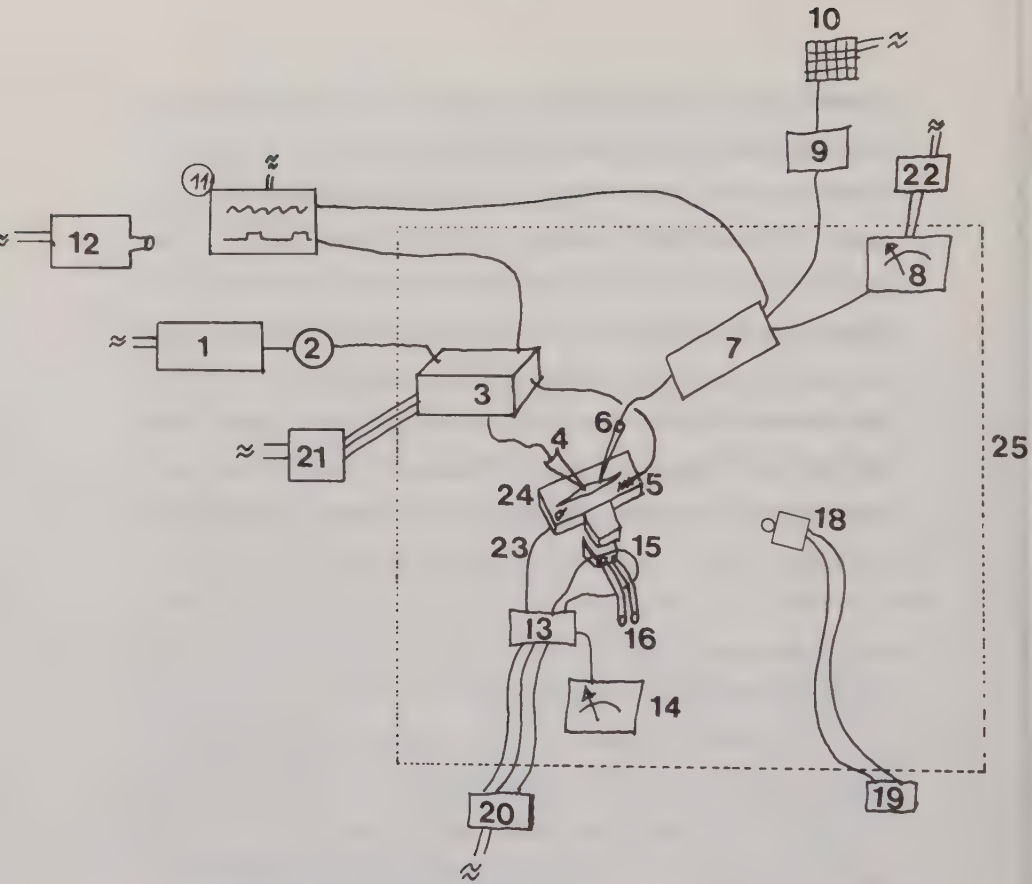


Abb. 9: Kompletter Versuchsaufbau

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| 1: Stimuliergerät | 14: Amperemeter |
| 2: Stimulusisoliereinheit | 15: Peltier-Element |
| 3: Konstante Stromquelle | 16: Wasseranschluß |
| 4: Stromelektrode | 17: Spiegel (unter d.Kammer) |
| 5: Referenzelektrode | 18: Lampe |
| 6: Spannungselektrode | 19 - 22: Gleichrichter |
| 7: Vorverstärker | 23: Temperaturfühler |
| 8: mV-Meter | 24: Versuchskammer |
| 9: Audioverstärker | 25: Faradaykäfig |
| 10: Lautsprecher | |
| 11: Kathodenstrahloszilloskop | |
| 12: Kamera | |
| 13: Temperaturregler | |

Tabelle der benutzten Ringerlösungen:

	NaCl mM	KCl mM	CaCl ₂ mM	MgCl mM	Puffer	pH	Überschuß gegen- über Normalringer mM
Normalrin- gerisoton	115	2,5	1,8	-	$\frac{\text{NaH}_2\text{PO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = \frac{2}{1}$	7,1	-
Glycerin- rinerlö- sung hyperton	115	2,5	1,8	-	"	7,1	400 Glycerin
mit NaCl hypertone Ringerlö- sung	345	2,5	1,8	-	HEPES	7,1	230 NaCl
Wasch- Ringerlsg. isoton	115	2,5	5	5	TES	7,1	5 MgCl 3,2 CaCl ₂
Niedrig-Na- Ringerlsg.	46	2,5	1,8	-	HEPES	7,1	Sucrose 400
Niedrig-Na- Ringer- hyperton	46	2,5	1,8	-	HEPES	7,1	Tris-Cl

Zur Vermeidung von Komplexbildungen wurden die hypertonen Lösungen mit HEPES und die Magnesium und Calcium im Überschuß enthaltene Waschlösung mit TES gepuffert.

(HEPES = N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2ethane sulfonic acid)

Ergebnisse

Einfluß der Glycerinbehandlung auf die frühe Nachdepolarisation

Die Bilder 10 - 12 zeigen typische Aktionspotentiale von Kontrollmuskelfasern; diesen sind in Abbildung 13 - 15 typische Aktionspotentiale von glycerinbehandelten Fasern gegenübergestellt. Aus beiden Gruppen wurden zum Vergleich jeweils eine Faser mit einem Membranpotential von - 60 mV, - 70 mV und - 80 mV ausgesucht. Diese Ableitungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der Hauptunterschied zwischen beiden Gruppen fällt sofort ins Auge: Die Kontrollmuskeln haben wesentlich stärkere frühe Nachdepolarisation.

Beide Fasertypen zeigen mit zunehmender Negativität ihrer Ruhepotentiale auch verstärkte frühe Nachdepolarisation.

Theoretisch könnte das Ruhepotential die Amplitude der frühen Nachdepolarisation direkt, oder über eine Änderung der treibenden Kraft der der frühen Nachdepolarisation zu Grunde liegenden Ströme, oder drittens durch eine Änderung der Permeabilität der Muskelfaser-membran beeinflussen. Um dies genauer zu untersuchen, wurde in Abbildung 16 das Ruhepotential gegen die Amplitude der frühen Nachdepolarisation aufgetragen. Dies erleichtert auch den Vergleich der Nachdepolarisation bei den verschiedenen Fasertypen. Aus Abbildung 16 ist

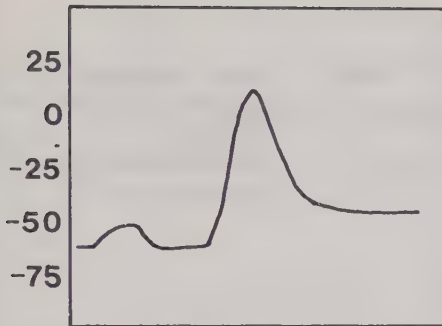


Abb. 10: Aktionspotential
einer Kontroll-
muskelfaser
Ruhepotential - 60 mV
frühe Nachdepolari-
sation - 45 mV

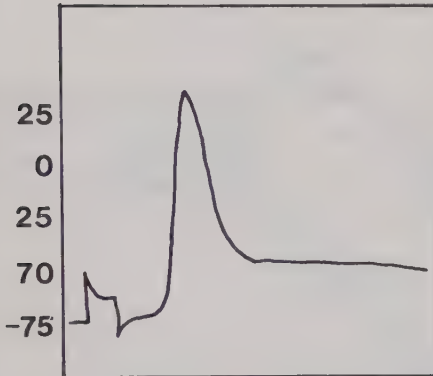


Abb. 11: Aktionspotential
einer Kontroll-
muskelfaser
Ruhepotential - 70 mV
frühe Nachdepolari-
sation - 43 mV

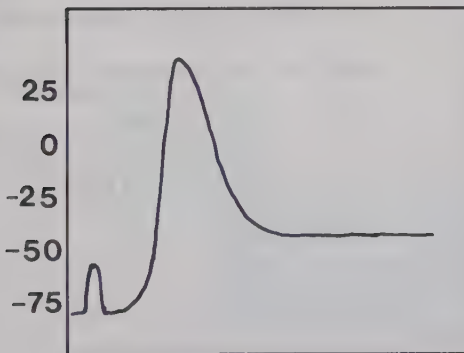


Abb. 12: Aktionspotential
einer Kontroll-
muskelfaser
Ruhepotential - 80 mV
frühe Nachdepolari-
sation - 41 mV

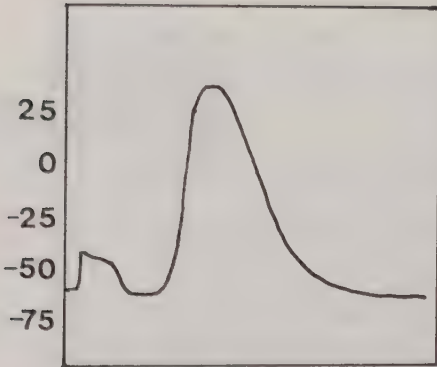


Abb. 13: Aktionspotential einer
glycerinbehandelten
Muskelfaser
Ruhepotential - 60 mV
frühe Nachdepolarisation - 60 mV

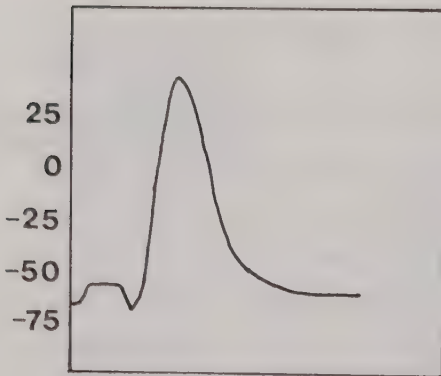


Abb. 14: Aktionspotential einer
glycerinbehandelten
Muskelfaser
Ruhepotential - 68 mV
frühe Nachdepolarisation - 60 mV

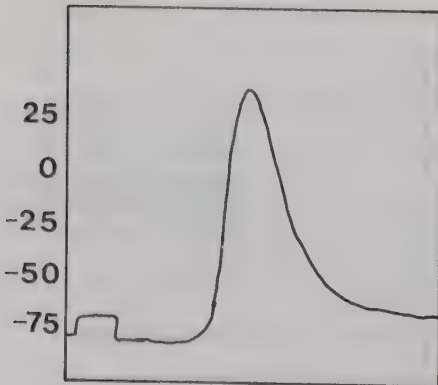
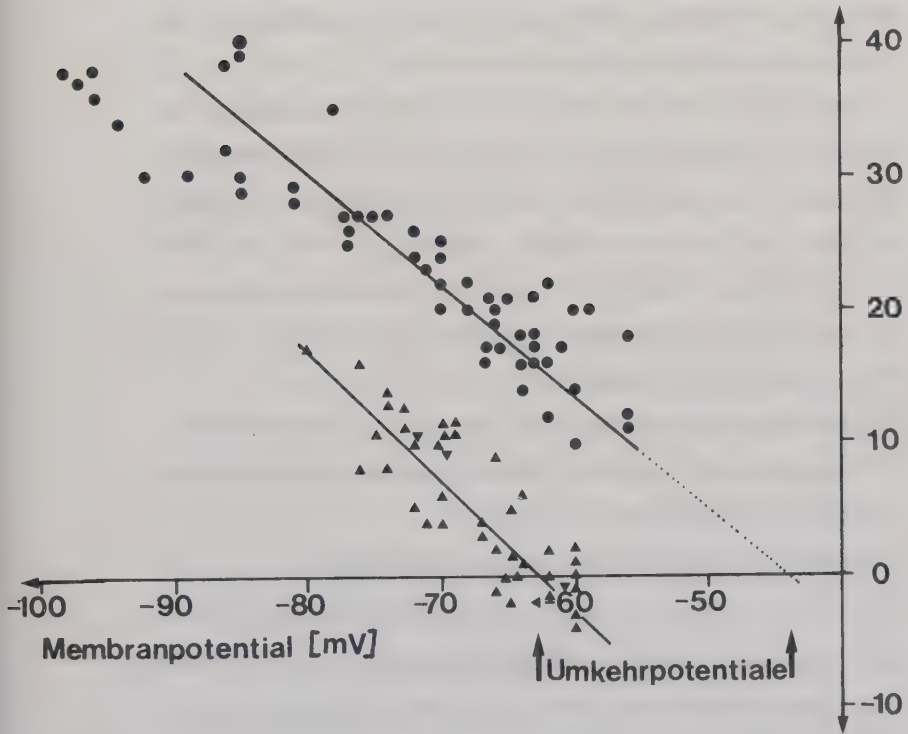


Abb. 15: Aktionspotential einer
glycerinbehandelten
Muskelfaser
Ruhepotential - 80 mV
frühe Nachdepolarisation - 63 mV

leicht abzulesen, daß bei beiden Datengruppen eine annähernd lineare Beziehung besteht zwischen Membranpotential und früher Nachdepolarisation. Man sieht, daß die beiden Kurven parallel verschoben sind, d.h. das

Amplitude der frühen
Nachdepolarisation [mV]



Nachhyperpolarisation

Abb. 16: Amplitude der frühen Nachdepolarisation bei verschiedenen Membranpotentialen. Die weite Streuung der einzelnen Punkte ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß Werte von verschiedenen Fasern aus vielen Muskeln stammen.
●: Kontrollfasern
▲: Glycerinbehandelte Fasern

Potentialniveau, das von der frühen Nachdepolarisation erreicht wird, ist bei glycerinbehandelten Fasern (untere Kurve) gegenüber den Kontrollmuskelfasern um ca. 15 mV in negativer Richtung verschoben. Außerdem ist in der Abbildung zu erkennen, daß in glycerinbehandelten Fasern bei Membranpotentialen zwischen - 50 mV und - 60 mV die frühe Nachdepolarisation ihre Richtung umkehrt, also eine Nachhyperpolarisation darstellt.

Das Membranpotentialniveau bei dem die frühe Nachdepolarisation seine Richtung ändert, d.h. wo die Nachdepolarisation in eine Nachhyperpolarisation übergeht wurde von Gage und Eisenberg (Gage & Eisenberg 1969) als Umkehrpotential (reversal potential) bezeichnet. Dieses Umkehrpotential entspricht dem auf Seite 48 beschriebenen "Gleichgewichtspotential".

Die Membrankapazitäten der in Abbildung 16 aufgeführten glycerinbehandelten Fasern lagen einheitlich um $2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, die der Kontrollfasern um $5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Das Konzept des "Gleichgewichtspotentials"

Die frühe Nachdepolarisation scheint wie ein synaptisches Potential oder ein Hodgkin/Huxley-Strom vom Membranpotential abhängig zu sein, seine Größe und Richtung erscheinen in einem weiten Bereich proportional der Differenz zwischen Membranpotential und einem "Gleichgewichtspotential"; das Vorzeichen der frühen Nachdepolarisation hängt also davon ab, ob das Ruhepotential negativer oder positiver als das "Gleichgewichtspotential" ist (siehe

Diskussion). Wegen dieser Analogie erschien es praktisch, die elektrischen Eigenschaften der Skelettmuskelfaser unter verschiedenen Bedingungen rein deskriptiv durch dieses Umkehrpotential bzw. "Gleichgewichtspotential" zu charakterisieren. Dadurch soll jedoch nicht unbedingt impliziert werden, daß bei diesem Potential tatsächlich ein elektrochemisches Gleichgewicht vorliegt; es ist durchaus möglich, daß diese Umkehr der Richtung des Aktionspotentials auf einem anderen Mechanismus beruht. Dieses "Gleichgewichtspotential" liegt bei glycerinbehandelten Fasern bei ungefähr - 63 mV und bei Kontrollfasern bei - 45 mV.

(Da bei Membranpotentialen von - 45 mV normalerweise kein Aktionspotential mehr auslösbar ist, konnte bei Kontrollfasern das "Gleichgewichtspotential" nicht als der Punkt bestimmt werden, bei dem die Nachdepolarisation in eine Nachhyperpolarisation übergeht; stattdessen wurde es extrapoliert aus Differenz zwischen Membranpotential und Amplitude der frühen Nachdepolarisation bei verschiedenen Membranpotentialen.)

Veränderung des Membranpotentials

Um die Amplitude und Richtung der frühen Nachdepolarisation in Abhängigkeit vom Membranpotential zu charakterisieren, wurden anfänglich einfach Muskelfasern verglichen, die umständehalber ein verschiedenes Ruhepotential hatten. Dadurch ergab sich jedoch eine starke Streuung der Meßwerte (siehe Abbildung 16).

Eine bessere Möglichkeit, das Ruhepotential zu variieren, besteht darin, viele Aktionspotentiale von der gleichen Muskelfaser abzuleiten und zwar bei verschiedenen Ruhepotentialen dieser Faser.

Es gibt zwei Methoden dies zu erreichen:

Die eine ist, einfach solange zu warten, bis das Ruhepotential von selbst kleiner wird; oft passiert das infolge von unvermeidlichen Leckströmen um die intrazellulären Elektroden. In der Tat waren diese Leckströme das größte Hindernis bei der Durchführung vieler Messungen an einer einzelnen Faser, da diese durch sich summierende minimale Membranverletzungen, wie sie nun einmal nicht zu vermeiden sind, oft frühzeitig zu Grunde gingen.

Die zweite Methode, die gleiche Faser bei verschiedenen Ruhepotentialen zu beobachten, ist die, durch eine weitere intracelluläre Elektrode einen kontinuierlichen Strom in die Faser zu injizieren. Durch Variierung der Stromstärke bzw. der Stromrichtung läßt sich so das Ruhepotential auf jeden beliebigen Wert einstellen, ohne daß dabei die Eigenschaften der Membran direkt beeinflußt würden (vgl hierzu Seite 31).

Die mit diesen beiden Methoden gewonnenen Meßwerte bestätigen die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse. Abbildung 17 zeigt, daß bei Veränderung des Membranpotentials durch Strominjektion fast identische Ergebnisse erzielt werden. Abbildung 17 stellt die Daten einer glycerinbehan-

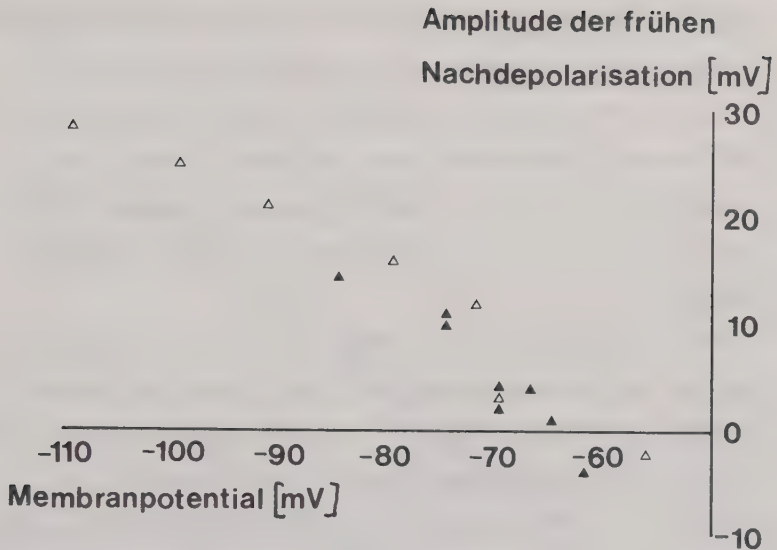


Abb. 17: Amplitude der frühen Nachdepolarisation einer glycerinbehandelten Muskelfaser bei verschiedenen Membranpotentialen

- ▲: natürliches Membranpotential
- △: durch Injektion eines konstanten Stromes manipuliertes Membranpotential

delten Faser dar, deren Membranpotential durch einen applizierten Strom über einen weiten Bereich variiert wurde. Das ursprüngliche Membranpotential lag bei - 85 mV; es sank dann durch Leckströme bis auf - 63 mV ab. Durch einen hyperpolarisierenden Strom wurde es daraufhin bis auf 108 mV angehoben; danach wurde der Strom umgepolt und das Membranpotential auf - 55 mV gesenkt. Die Tatsache, daß bei vergleichbarem Membranpotential vor und nach Aufzwingen eines Stromes die frühe Nachdepolarisation so gut wie gleich ist, zeigt wie unbeeinflusst der Aktionspotentialmechanismus durch die Strominjektionen bleibt.

Der Einfluß der Temperatur auf die frühe Nachdepolarisation

In Abbildung 18 ist neben den Kontrolldaten und den Daten für die glycerinbehandelten Fasern eine dritte Datengruppe aufgetragen, die von Fasern stammt, die genauso wie die Kontrollmuskeln behandelt wurden, mit dem Unterschied, daß diese Fasern bei 10°C untersucht wurden.

Diese neuen Daten liegen wieder parallel zu jenen Daten, welche die glycerinbehandelten Fasern bzw. die Kontrollfasern repräsentieren. Dabei ist das Potentialniveau, das von der frühen Nachdepolarisation erreicht wird, bei den gekühlten Fasern gegenüber den glycerinbehandelten wiederum um ca. 10 mV in negativer Richtung verschoben.

Zum Vergleich mit den ersten beiden Fasertypen sind in Abbildung 19, 20 und 21 typische Aktionspotential von gekühlten Fasern aufgezeichnet. Um den Vergleich mit Abbildung 10-12 bzw. Abbildung 13-15 zu ermöglichen, wurden in Abbildung 19 - 21 wieder je eine Faser mit einem Membranpotential von - 60, - 70 und von - 80 mV ausgewählt.

Versuche auch glycerinbehandelte Fasern bei 10°C zu untersuchen scheiterten daran, daß die Glycerinbehandlung bei Raumtemperatur durchgeführt werden muß, um effektiv zu sein (siehe Diskussion). Anschließende Änderung der Temperatur führte oft zu schneller Zerstörung der Muskelfasern; wo dies nicht der Fall war, konnten keine konstanten Ergebnisse erzielt werden. Spontane Kontraktionen, die die Elektroden spitze abbrachen, beendeten meist die Versuche.

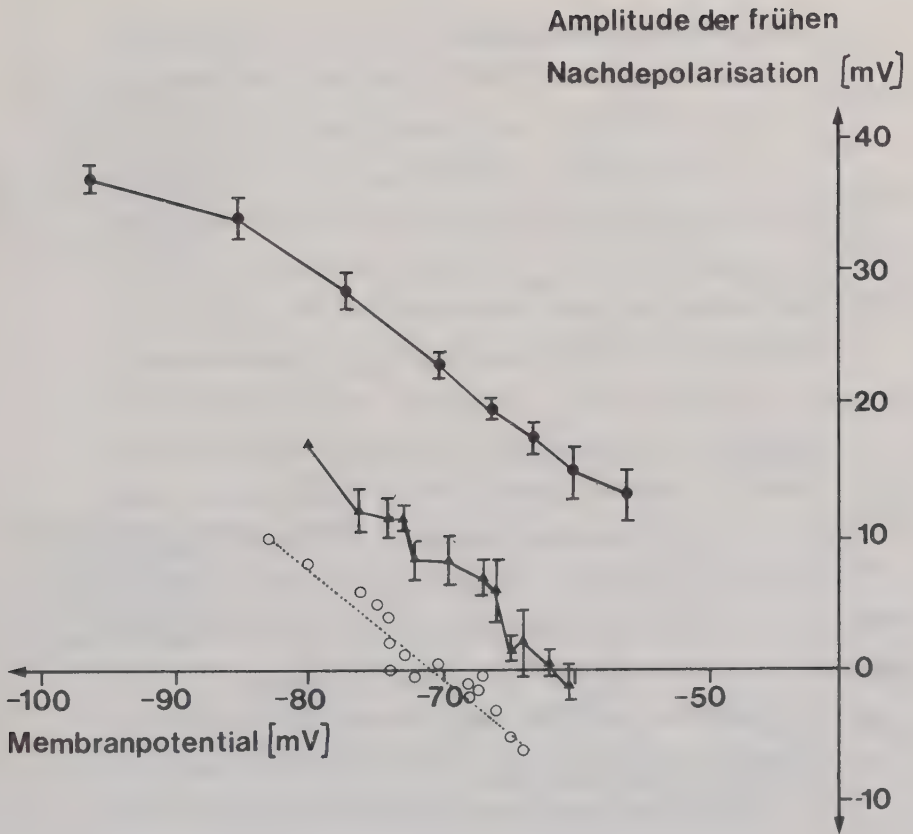


Abb. 18: Amplitude des frühen Nachpotentials bei verschiedenen Membranpotentialen

●: Kontrollmuskelfasern

▲: Glycerinbehandelte Muskelfasern

○: Gekühlte Fasern

Die Streubereiche in der Kurve der Kontroll- bzw. der glycerinbehandelten Muskelfasern geben die Standardabweichung der einzelnen von verschiedenen Muskelfasern stammenden Werte von deren Durchschnittswert an.

Für die gekühlten Fasern wurde keine Standardabweichung errechnet, da nicht mehr als die eingetragenen Werte gemessen wurden.

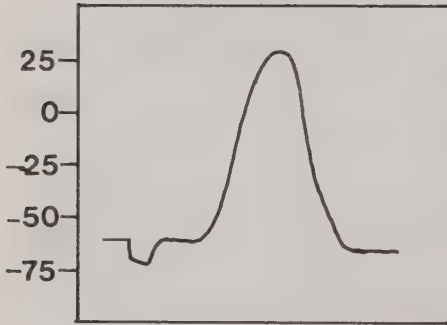


Abb. 19: Aktionspotential
einer auf 10°C
abgekühlten
Froschmuskelfaser
Abszisse: Zeit
Ordinate: Membranpot.
Membranpot.: - 60 mV
frühe Nachdep.: - 66

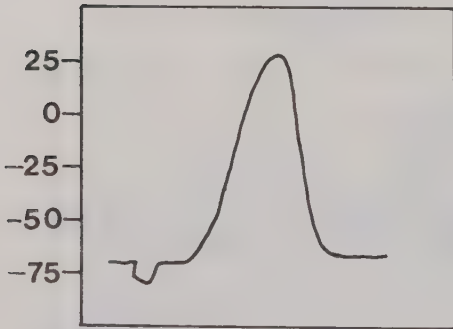


Abb. 20: Aktionspotential
einer auf 10°C
abgekühlten
Froschmuskelfaser
Membranpot.: - 70 mV
frühe Nachdep.: - 70



Abb. 21: Aktionspotential
einer auf 10°C
abgekühlten
Froschmuskelfaser
Membranpot.: - 80 mV
frühe Nachdep.: - 72 mV

Einfluß der Repolarisationsgeschwindigkeit bzw. der
Spikeamplitude auf die frühe Nachdepolarisation

Bei der Auswertung anfänglicher Ergebnisse zeigte sich, daß bei Fasern mit großer Spikeamplitude bzw. mit großer Repolarisationsgeschwindigkeit große frühe Nachdepolarisationen gefunden wurden. Wie aus Abbildung 22 ersichtlich ist, sind Spikeamplitude und Repolarisationsgeschwindigkeit eng miteinander korreliert. Man sieht, daß niedrige Spikes sich bis zu viermal soviel Zeit lassen für die Repolarisation als hohe Spikes. Die linke Datengruppe repräsentiert sowohl Kontrollfasern als auch glycerinbehandelte Fasern bei Raumtemperatur. Beide repolarisieren bis zum Beginn der frühen Nachdepolarisation mit gleicher Geschwindigkeit.

Auf 10°C abgekühlte Fasern (rechte Datengruppe in Abbildung 22) zeigen auch eine fast lineare Beziehung zwischen Spikeamplitude und Repolarisationsgeschwindigkeit, mit dem Unterschied, daß diese Fasern wesentlich langsamer repolarisieren.

Die weite Streuung der Daten wird wieder auf die Tatsache zurückgeführt, daß viele verschiedene Muskelfasern repräsentiert sind. Die eingekreisten Werte stammen alle aus der gleichen Muskelfaser.

Wie jedoch aus den in der Diskussion auf Seite
angestellten Überlegungen hervorgeht, sind Repolarisations-
geschwindigkeit und Spikeamplitude nicht die Hauptfaktoren,
die die Größe der frühen Nachdepolarisation bestimmen.

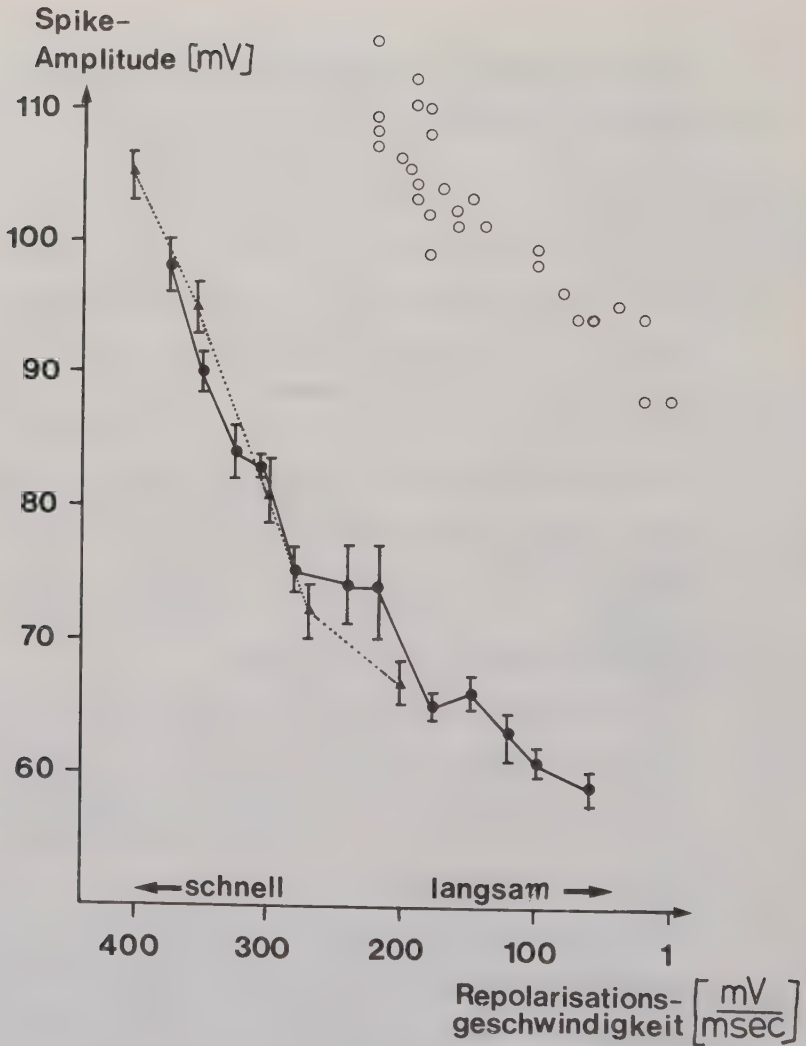


Abb. 22: Repolarisationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Spikeamplitude (= Differenz zwischen maximalem overshoot und "Gleichgewichtspotential" der frühen Nachdepolarisation)

- Kontrollfasern
- ▲—▲ glycerinbehandelte Fasern
- gekühlte Fasern

(Streubereiche entsprechen denen in Abb. 18)

Diskussion

Methodik der Glycerinbehandlung

Abhängigkeit von der Temperatur Wenn man Versuche am glycerinbehandelten Froschmuskel bei verschiedenen Temperaturen durchführen will, ist es notwendig, zunächst einmal zu kontrollieren, ob die Glycerinbehandlung selbst etwa durch Temperaturänderungen beeinflussbar ist.

Es wurde deshalb als Voruntersuchung die Glycerinbehandlung bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß sie bei Raumtemperatur die schon beschriebenen Wirkungen (siehe Einleitung Seite 17) hat, während sie bei über 27°C bzw. um 10°C oder niedriger nicht in gewohnter Weise effektiv ist. Dabei scheint es keine graduellen Unterschiede in der Effektivität zu geben. In bei 10°C glycerinbehandelten und untersuchten Muskeln wiesen zwar vereinzelt Fasern erniedrigte Membrankapazitäten auf, was bei diesen Fasern auf die Effektivität der Glycerinbehandlung schließen läßt, doch unterscheiden sich diese Fasern auch bezüglich der frühen Nachdepolarisation nicht von Raumtemperaturfasern. Es scheint sich also um einen sprunghaften und nicht graduellen Effekt der Temperatur auf die Glycerinbehandlung zu handeln.

Um herauszufinden, welche Phase der Glycerinbehandlung die temperaturempfindliche ist, bzw. ob beide Phasen

gleich empfindlich sind, wurde bei einer Reihe von Versuchen nach der Immersion des Muskels in Glycerin-Ringer abrupt die Temperatur verändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt:

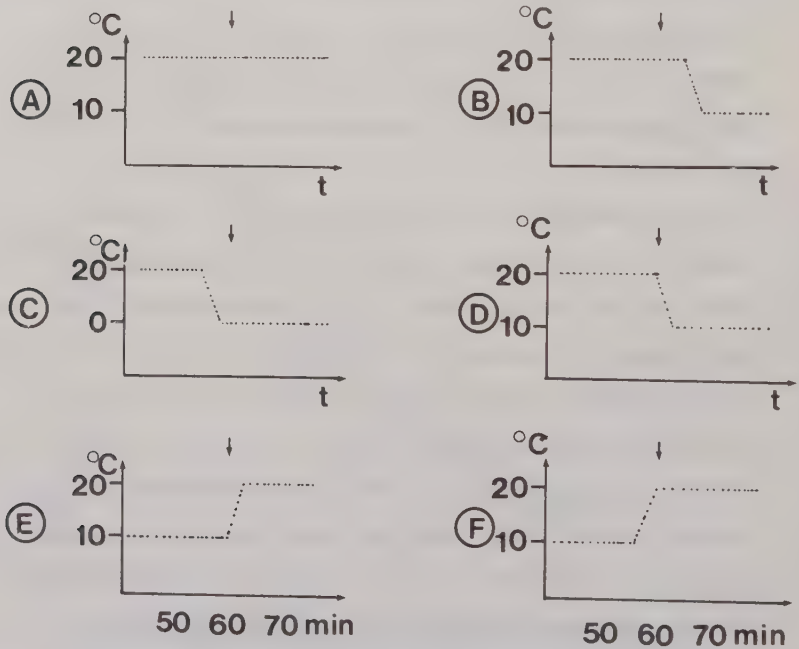


Abb. 23: Abhängigkeit der Glycerinbehandlung von der Temperatur

↓ gibt den Zeitpunkt an, zu dem der Muskel aus der Glycerinringer-Lösung in Normalringer gebracht wird.

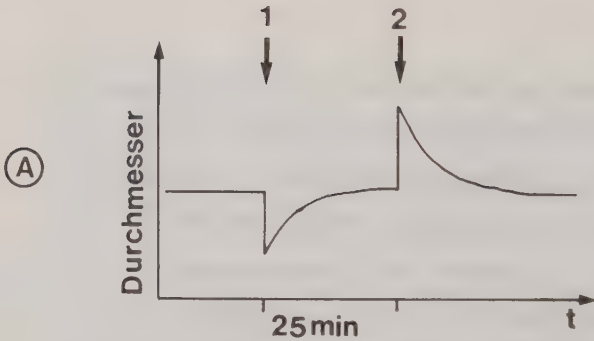
Die Glycerinbehandlung ist nur in den Fällen A und B effektiv, d.h. bis mindestens 5 Min. nach Rückkehr in Normalringer muß die Temperatur bei 20°C liegen.

(Weitere Erklärungen siehe Text)

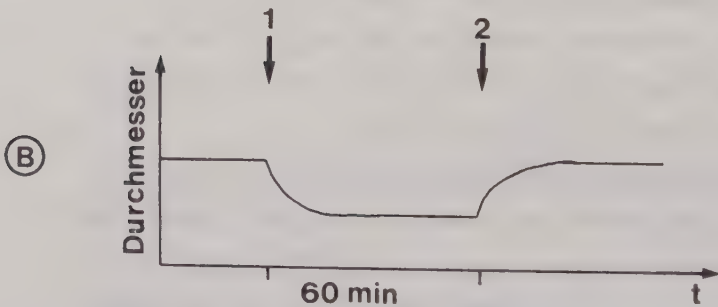
Offensichtlich kommt der Temperatur, die beim Übergang von Glycerin-Ringer in Normal-Ringer herrscht, entscheidende Bedeutung zu. Dagegen ist die Temperatur nach mehr als fünfminütiger Immersion in Normal-Ringer in Bezug auf die Effektivität der Glycerinbehandlung bedeutungslos (Abbildung 24 a und b). Interessanterweise besteht eine solche zeitliche Beschränkung der Temperaturabhängigkeit auf der anderen Seite des Glycerinringer-Normalringer-Überganges nicht: Die Immersion in Glycerinringer muß während ihrer ganzen Dauer bei Raumtemperatur stattfinden, soll die Effektivität der Behandlung gesichert sein.

Volumenschwankungen des Muskelpräparates In hypertoner Lösung nimmt das Volumen einer Muskel-Zelle vorübergehend ab, während es in hypotoner Lösung vorübergehend zunimmt. Voraussetzung für einen diphasischen Verlauf der Volumenänderung ist natürlich eine gewisse Permeabilität der Membran für die betreffenden Ionen. Ist diese Permeabilität nicht vorhanden, so ist zu erwarten, daß die Volumenänderungen in hyper- bzw. hypotoner Lösung jeweils nur in einer Richtung verlaufen bis sich ein neues Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem osmotischen Druck hergestellt hat.

Als grobes relatives Maß für das Volumen der Muskelfasern wurde der Durchmesser des ganzen Musculus Sartorius-Präparates bestimmt. Abgemessen wurde jeweils nach einer Stunde Immersionszeit; zu diesem Zeitpunkt schien das Maximum der Volumenänderung erreicht zu sein, da $\frac{dV}{dt}$ dann praktisch gleich Null war.



Nach Dulhunty/Gage (1973). Einzelfaser



Eigene Messungen. Ganzer M.Sartorius

Abb. 24: Volumenänderungen einer einzelnen Muskelfaser (A) bzw. eines ganzen M.Sartorius (B) bei Wechsel von Normalringerlösung in hypertone Glycerinringerlösung (bei 1) und anschließender Rückkehr in Normalringerlösung (2)
Abszisse: Zeit
Ordinate: Muskel(-faser)-durchmesser.

Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 24 b dargestellt. Der Durchmesser der in Glycerinringer gemessen wurde, betrug $83\% (+ 2,5\%)$ jenes Durchmessers, den die gleichen Muskeln in Normalringer aufwiesen.

Nach einer Stunde Immersionszeit schien keine Tendenz zu bestehen, das ursprüngliche Volumen wieder anzunehmen. Es wäre allerdings voreilig aus dieser einphasigen Volumenänderung den Schluß zu ziehen, daß Glycerin nicht membrangängig sei, denn am Sartorius bestehen für zentral gelegene Fasern erhebliche Diffusionsbarrieren (Bozler 1961), so daß eine Stunde sicher nicht lang genug ist, eine gleichmäßige Verteilung des Glycerins zu erreichen. Nach inzwischen veröffentlichten Experimenten mit einzelnen Muskelfasern (Dulhunty & Gage, 1973) zeigt hier der zeitliche Verlauf der Volumenänderung das typische zweiphasische Bild. Dieses ist in Abbildung 24 a dem einphasischen Verlauf beim ganzen Sartorius in Abbildung 24 b gegenübergestellt.

Wie schon berichtet wurde als Kontrollmuskel immer ein Muskel in hypertoner Lösung verwendet. Es stellt sich die Frage, warum der glycerinbehandelte Muskel nicht in der gleichen Lösung analysiert wurde wie der Kontrollmuskel; unter Vermeidung verschiedener Auswirkungen der verschiedenen Lösungen auf zu bestimmende Größen wäre dann ein besserer Vergleich beider Präparate möglich.

Dazu ist zu sagen, daß der Glycerin-Effekt zumindestens teilweise ein osmotischer Effekt ist, der mit Volumenänderungen in Zusammenhang steht. Eine erneute Immersion

des glycerinbehandelten Muskels in hypertone Lösung, d.h. erneutes Schrumpfen und Anschwellen würde also möglicherweise den Glycerin-Effekt beeinflussen.

Einige Versuche haben ergeben, daß glycerinbehandelte Fasern in hypertoner Lösung nach einer kurzen Phase spontaner Aktivität (möglicherweise durch Freisetzung von Ca^{++} aus zerstörten intrazellulären Speichern) recht schnell zu Grunde gehen.

Auf der anderen Seite kann der Kontrollmuskel nicht in Normalringer untersucht werden, sondern muß zur Verhinderung von Kontraktionen als Antwort auf die zur Kabelanalyse notwendigen Stimuli in hypertoner Ringerlösung untersucht werden.

Widersprüche der beschriebenen Ergebnisse zu denen von Gage & Eisenberg (1969)

Da vorliegende Ergebnisse in einigen Punkten in klarem Widerspruch zu Gage & Eisenberg stehen, halte ich es für wichtig noch einmal die Hauptunterschiede gegenüberzustellen.

1) Höhe des Umkehrpotentials

Gage & Eisenberg: Durch die Glycerinbehandlung wird das Umkehrpotential in die Nähe des Membranpotentials gerückt; unabhängig von der absoluten Höhe des Membranpotentials ist das Umkehrpotential immer einige mV negativ gegenüber dem Membranpotential.

Vorliegende Ergebnisse: Das Umkehr- oder "Gleichgewichtspotential" liegt bei glycerinbehandelten Muskelfasern zwischen - 60 mV und - 65 mV unabhängig vom Membranpotential.

2) Richtung der frühen Nachdepolarisation

Gage & Eisenberg: Die Richtung der frühen Nachdepolarisation ist in glycerinbehandelten Fasern immer entgegengesetzt der Richtung der frühen Nachdepolarisation der Kontrollfasern.

Vorliegende Ergebnisse: Bei Membranpotentialen positiv von - 63 mV entspricht die Richtung der frühen Nachdepolarisation der der Kontrollmuskelfasern; bei Membranpotentialen negativ von - 63 mV ist die Richtung der frühen Nachdepolarisation umgekehrt.

Was die Reversibilität des Glycerineffektes angeht stimmen meine Ergebnisse mit denen von Gage & Eisenberg vollkommen überein; vorliegende Ergebnisse stehen damit zusammen mit denen von Gage & Eisenberg in Widerspruch zu Hendersons (1970) Beobachtung, daß sowohl die frühe Nachdepolarisation als auch die Fähigkeit zur Kontraktion vier bis fünf Stunden nach Glycerinbehandlung wiedererlangt werden könnte.

Zusammenhang zwischen T-System und früher Nachdepolarisation im Froschmuskel

Wie in der Einleitung (Seite 16) schon beschrieben wurde, dürfte möglicherweise eine Akkumulation von K^+ -Ionen im T-System des Froschskelettmuskels für die späte Nachdepolarisation verantwortlich sein (Freygang, Goldstein, Hellam 1964). Ob das T-System auch etwas mit der frühen Nachdepolarisation zu tun hat, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Adrian und Freygang (1962) zeigten, daß beiden Nachdepolarisationen nicht der gleiche Mechanismus zu Grunde liegen kann.

Vorliegende Ergebnisse können diesen möglichen Zusammenhang zwischen früher Nachdepolarisation und T-System zwar nicht klären, immerhin helfen sie aber die theoretischen Möglichkeiten einzugrenzen:

Aus der Tatsache, daß der Mechanismus, der der frühen Nachdepolarisation zu Grunde liegt durch die Glycerinbehandlung zwar beeinträchtigt wird, aber immerhin noch existiert, kann geschlossen werden, daß entweder die frühe Nachdepolarisation seinen Ursprung nicht im T-System hat oder aber, daß die Glycerinbehandlung die T-Tubuli nicht vollkommen funktionsunfähig macht.

Einfluß von Membrankapazität und Repolarisations-
geschwindigkeit auf die Amplitude der frühen
Nachdepolarisation

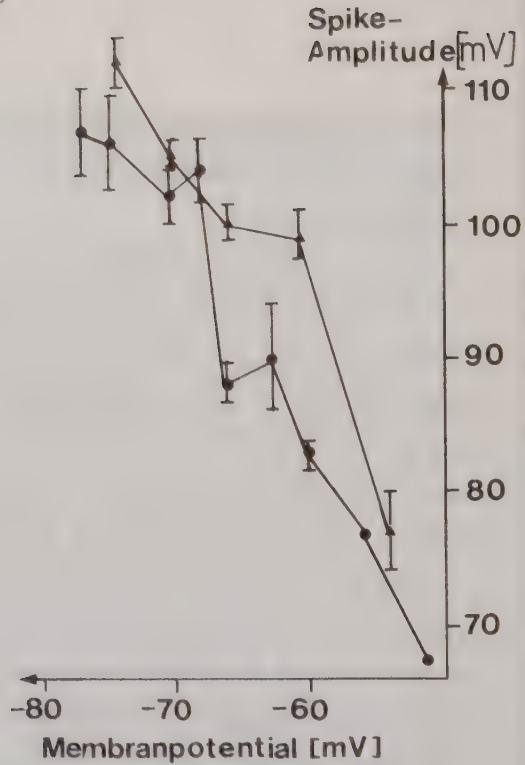
Da zum eine eine Korrelation besteht, sowohl zwischen dem Membranpotential und der Amplitude der frühen Nachdepolarisation (Abbildung 18, Seite 53), als auch zwischen Membranpotential und Spikeamplitude (Abbildung 25, Seite 66) und da zum anderen eine Korrelation besteht zwischen Repolarisationsgeschwindigkeit und Spikeamplitude (Abbildung 22, Seite 56), ergibt sich also eine Koinzidenz von schneller Repolarisationsgeschwindigkeit mit einer großen Amplitude der frühen Nachdepolarisation.

Es stellt sich also die Frage, ob die Änderung der frühen Nachdepolarisation bei Abkühlung bzw. nach Glycerinbehandlung möglicherweise auf eine Änderung der Repolarisationsgeschwindigkeit zurückgeführt werden kann.

Dies konnte durch folgende in Abbildung 26 dargestellten Befunde ausgeschlossen werden:

Aus allen drei Fasergruppen (Kontrollfasern, glycerinbehandelte, und auf 10°C abgekühlte) ist in Abbildung 26 von jeweils einer typischen Faser die Repolarisationsgeschwindigkeit gegen die Amplitude der frühen Nachdepolarisation aufgetragen. Die Zahlen neben den einzelnen Punkten geben das jeweilige Membranpotential der Muskelfaser an.

Abb. 25: Abhängigkeit der Spikeamplitude vom Membranpotential
Kontrollmuskelfaser
Glycerinbehandelte Muskelfaser



Amplitude der frühen Nachdepolarisation

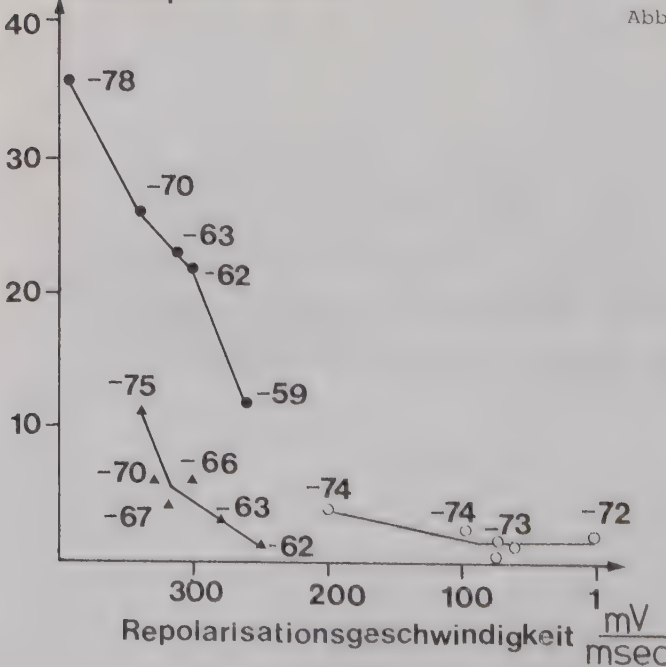


Abb. 26: Korrelation zwischen früher Nachdepolarisation und Repolarisationsgeschwindigkeit bei den verschiedenen Fasertypen.
● Kontrollfaser
▲ Glycerin Faser
○ ogekühlte Faser

Die Zahlen neben den einzelnen Punkten geben das Membranpotential (in mV) an, bei dem das betreffende Aktionspotential abgeleitet wurde.

Man sieht, daß sich die Kontrollfaser von der glycerin-behandelten Faser darin unterscheidet, daß die Amplitude der frühen Nachdepolarisation bei ersterer um einen konstanten Betrag höher ist.

Es unterscheiden sich außerdem glycerinbehandelte Fasern von gekühlten Fasern in hypertonischer Lösung darin, daß letztere wesentlich langsamer repolarisieren, wobei die Amplitude der frühen Nachdepolarisation bei diesen beiden Fasertypen gleich ist.

Es gibt also zwei völlig verschiedene Bedingungen, zwischen denen bis jetzt noch kein Zusammenhang zu sehen ist, unter denen die Amplitude der frühen Nachdepolarisation unabhängig vom Membranpotential kleiner ausfällt, das heißt, unter denen das "Gleichgewichtspotential" in negativer Richtung verschoben wird:

Das eine ist die Glycerinbehandlung die mit einer Kapazitätsminderung der Muskelfasermembran einhergeht.

Das andere ist die Abkühlung, welche mit einer Verzögerung der Repolarisation einhergeht.

Es haben also zum einen Kontrollfasern und glycerin-behandelte Fasern bei gleicher Repolarisationszeit, und zum anderen gekühlte Fasern und Kontrollfasern bei gleicher Kapazität verschieden stark ausgeprägte frühe Nachdepolarisationen. Folglich kann also die Repolarisationsgeschwindigkeit ebensowenig wie die Kapazität alleine direkten Einfluß auf die Amplitude der frühen Nachdepolarisation haben.

Worauf beruht die frühe Nachdepolarisation

Der Wert der Glycerinbehandlung zur Klärung des Ursprungs der frühen Nachdepolarisation ist begrenzt, weil sich herausgestellt hat, daß die Wirkungen des Glycerins vielfältiger sind als man ursprünglich angenommen hat. Es ist jedenfalls sicher, daß die Unterbrechung der elektromechanischen Kopplung durch Glycerin nicht oder nicht nur auf einer Disruption des T-Systems (Dulhunty & Gage 1973, vgl. Einleitung Seite 22; Chandler et al 1976). Es ist auch keineswegs ausgeschlossen, daß auch der Einfluß von Glycerin auf die frühe Nachdepolarisation unabhängig von der Unterbrechung des T-Systems sein könnte.

Trotzdem ist es möglich durch Analyse der Veränderungen des Aktionspotentials unter Glycerinbehandlung die Zahl der möglichen Ursachen für die frühe Nachdepolarisation etwas einzugrenzen:

1) Die frühe Nachdepolarisation beruht nicht auf einer Akkumulation von K-Ionen in den Tubuluslumina und anschließen- dem langsamen Herausdiffundieren wie dies für das späte Nachpotential (late negative afterpotential) gezeigt werden konnte (Freygang/Goldstein/Hellam 1964, vgl. Einleitung Seite 16); denn dieser Mechanismus könnte nicht die Abhängigkeit der Richtung der frühen Nachdepolarisation von dem Niveau des Membranpotentials also die Existenz eines Umkehrpotentials erklären (vgl. Abbildung 16).

2) Entsprechend dem in der Diskussion auf den Seiten 65 - 67 Gesagten ist die frühe Nachdepolarisation auch von der durch das T-System repräsentierten Membrankapazität weitgehend unabhängig.

3) Ebenso ist die Amplitude der frühen Nachdepolarisation wahrscheinlich nicht von der Repolarisationsgeschwindigkeit abhängig (vgl. Diskussion Seite 10 - 12).

Da die frühe Nachdepolarisation sowohl vor als auch nach Glycerinbehandlung in Größe und Richtung vom Membranpotential abhängig ist, ist es möglich, daß die frühe Nachdepolarisation auf dem passiven Fluß von Ionen beruht, der von einem "Gleichgewichtspotential" abhängig ist (siehe Seite 48).

Beruht die frühe Nachdepolarisation auf einem Na^+ -Strom?

Die Möglichkeit, daß die frühe Nachdepolarisation zumindest teilweise auf einem Na^+ -Strom beruht, wurde durch unten beschriebene Experimente untersucht. Theoretisch könnte das Na^+ -Kanalsystem auf zwei Wegen bei der Bildung der frühen Nachdepolarisation eine Rolle spielen (vgl. Einleitung Seite 8 - 10): zum einen könnte das Einsetzen der Inaktivierung verzögert sein ($\tau_h \uparrow$), zum anderen könnte auch die Schließung der Activations-Gates bei der Repolarisation verzögert sein ($\tau_m \uparrow$). Beide Möglichkeiten hätten eine Erhöhung der Na^+ -Leitfähigkeit während der Repolarisationsphase zur Folge.

Um eine eventuelle Beteiligung von Na^+ -Strömen bei der Bildung der frühen Nachdepolarisation zu untersuchen, wurden Muskeln geprüft, die in einer Lösung lagen, die nur 7,5% des Na^+ -Gehaltes der sonst benutzten hypertonen Lösung aufwies (vgl. Lösungstabelle, Methoden Seite 43).

An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß zunächst eine Lösung mit noch geringerem Na^+ -Gehalt ausprobiert wurde, bei der die Hypertonizität durch Zugabe von 300 mM Tris-Cl erreicht wurde. Diese hypertone Lösung erwies sich aber nicht als geeignet Kontraktionen zu verhindern.

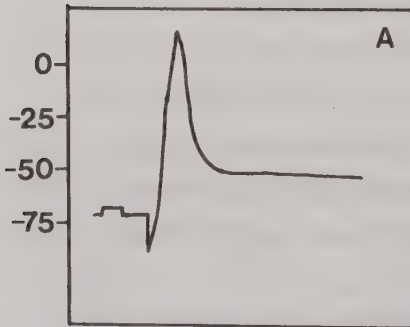


Abb. 27: Aktionspotential einer Muskelfaser⁺ in einer wenig Na^+ enthaltenden Ringerlösung
Membranpot. - 70 mV
frühe Nachdep. - 52

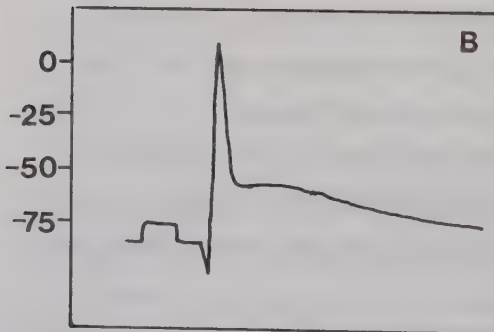


Abb. 28: Aktionspotential einer Muskelfaser⁺ in einer wenig Na^+ enthaltenden Ringerlösung
Membranpot. - 80 mV
frühe Nachdep. - 57

Wie zu erwarten haben Muskelfasern in Ringerlösung geringer Na^+ -Konzentration ein geringfügig erhöhtes Ruhepotential und einen stark verminderten Overshoot. Die Amplitude der frühen Nachdepolarisation und die Repolarisationsgeschwindigkeit jedoch erfuhren im Vergleich zum Kontrollmuskel keine Veränderungen. In Abbildung 27 und 28 sind zwei Aktionspotentiale abgebildet, die in Ringerlösung niedriger Na^+ -Konzentration aufgezeichnet wurden. Die Amplitude der frühen Nachdepolarisation zeigt bei den Fasern in Ringerlösung geringer Na^+ -Konzentration die gleiche Beziehung zum Membranpotential wie der Kontrollmuskel.

Eine signifikante Änderung der Na^+ -Konzentration hat also keinen Einfluß auf die frühe Nachdepolarisation. Damit glaube ich ausschließen zu können, daß die frühe Nachdepolarisation auf einem durch Na^+ -Ionen vermittelten Strom beruht.

Beruht die frühe Nachdepolarisation auf einem Cl^- -Strom?

Die Cl^- -Permeabilität der Muskelfasermembran ist über einen großen Membranpotentialbereich und einen großen Bereich von Konzentrationsverhältnissen zwischen Intra- und Extrazellulärraum ziemlich konstant (Hodgkin/Horowicz 1959).

Cl^- -Ionen scheinen mehr oder weniger passiv verteilt zu sein. Da außerdem die Cl^- -Permeabilität der Tubulusmembran äußerst gering ist, erscheint es ziemlich unwahrscheinlich, daß ein Cl^- -Strom in der Tubulus-Membran mit der frühen Nachdepolarisation etwas zu tun hat; dennoch kann eine Änderung der Cl^- -Permeabilität der Oberflächenmembran als Ursache für die frühe Nachdepolarisation nicht ausgeschlossen werden.

Beruht die frühe Nachdepolarisation auf einem K^+ -Strom?

Die Rolle der K^+ -Ionen kann leider nicht so einfach durch Konzentrationsänderungen erforscht werden wie die Rolle der Na^+ -Ionen. Eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentrationen würde zu einer raschen Depolarisation der Membran führen; eine intrazelluläre Konzentrationsänderung ist wegen technischer Schwierigkeiten wohl nicht möglich. Bei Erniedrigung der extrazellulären K^+ -Konzentration kommt es zu einer Erhöhung des Ruhepotentials (Goldman-Gleichung) und zu einer Verkleinerung der Amplitude der frühen Nachdepolarisation, d.h. das "Gleichgewichtspotential" der frühen Nachdepolarisation und das Membranpotential nähern sich einander an (Henderson 1970). Diese beiden Erscheinungen sind also Folge der Erhöhung der K^+ -Konzentrationsdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum also der Erhöhung der treibenden Kraft für K^+ -Ionen. Die Tatsache, daß die frühe Nachdepolarisation auf diese Erniedrigung der extrazellulären K^+ -Konzentration sensibler reagiert als das Membranpotential, könnte dadurch erklärt werden, daß das Membranpotential von den Na^+ -Konzentrationen und der Na^+ -Leitfähigkeit mitbestimmt wird, während das für die frühe Nachdepolarisation nicht zutrifft.

Es erscheint also möglich, daß ein K^+ -Strom zumindest zu einem gewissen Teil an der Bildung der frühen Nachdepolarisation beteiligt ist.

Alles in allem liefern diese Experimente und Überlegungen über die Na^+ -, K^+ - und Cl^+ -Ströme also Anhaltspunkte dafür, daß von diesen dem K^+ -Strom die meiste Bedeutung bei der Erklärung der frühen Nachdepolarisation zukommt.

Wenn die frühe Nachdepolarisation überhaupt auf einem Ionenstrom beruht, ist es wahrscheinlich, daß K^β -Ionen daran beteiligt sind.

Lokalisation der K^+ - und Der Cl^- -Kanäle Hodgkin/Horowicz (1960) fanden heraus, daß die Membranpotentialänderung nach einer rechteckförmigen Änderung der extrazellulären Cl^- -Konzentration sich schneller einstellt als die Potentialänderung nach einer entsprechenden K^+ -Konzentrationsänderung; sie schlossen daraus, daß die tubulären Cl^- -Kanäle näher an der äußeren Oberfläche der Muskelzelle liegen als die K^+ -Kanäle.

Beobachtungen der Strom/Spannungs-Verhältnisse ließen Adrian & Freygang (1962) vermuten, daß die Oberflächenmembran große und gleichmäßige Cl^- -Leitfähigkeit aufweist, während die K^+ -Leitfähigkeit hauptsächlich in den Wänden des T-Systems lokalisiert ist.

Eisenberg & Gage (1969) bestimmten die Verteilung der verschiedenen Leitfähigkeiten, indem sie die Leitfähigkeit der Membran von normalen und von "detubulierten", d.h. glycerinbehandelten Fasern bei normalem und erniedrigtem pH des Extrazellulärtraumes maßen. Sie rechneten aus, daß die ganze Cl^- -Leitfähigkeit auf die Oberflächenmembran zurückzuführen ist und daß zwei Drittel der K^+ -Leitfähigkeit

auf den Wänden des T-Systems beruhen.

Diese Ergebnisse tragen zur Erklärung des Verschwindens der frühen Nachdepolarisation in glycerinbehandelten Muskelfasern bei. Daß die K^+ -Leitfähigkeit in der Hauptsache im T-System lokalisiert zu sein scheint, und daß außerdem die frühe Nachdepolarisation möglicherweise durch K^+ -Ströme bedingt ist, wofür die am Anfang dieses Kapitels angestellten Überlegungen Anhaltspunkte bieten, macht leicht verständlich, daß bei glycerinbehandelten Fasern, bei denen die Verbindung zwischen T-System und Extrazellulärraum gestört ist, die frühe Nachdepolarisation beeinträchtigt wird.

Aber die in der vorliegenden Arbeit geschilderten Ergebnisse zeigen, daß der Mechanismus, der die frühe Nachdepolarisation zu Grunde liegt, auch in glycerinbehandelten Fasern vorhanden ist, jedoch auf einem anderen "Gleichgewichtspotential". Deshalb muß man annehmen, daß die frühe Nachdepolarisation auf einem komplizierteren Mechanismus beruht, als bisher angenommen wurde.

Die Glycerinbehandlung hat offensichtlich sehr komplexe Auswirkungen auf die Struktur und Funktion von Muskelzellmembranen. Sie hat zwar einige Aufschlüsse gebracht über die Membrankapazität und die Lokalisation der verschiedenen Ionenleitfähigkeiten, aber die elektrischen Eigenschaften der Membran der Tubuli werden erst dann im Detail aufgedeckt werden können, wenn noch bessere und feinere Methoden zur Verfügung stehen.

Anhang

Kabelanalyse der Muskelfaser

Die Analogie einer Muskelfaser zu einem elektrischen Kabel ist auf den ersten Blick nicht gerade durchschaubar. Aber in beiden Fällen gibt es ein leitendes Inneres (der Leiter eines Kabels, das Myoplasma) das von der Umgebung durch eine nicht gerade perfekte Isolierung getrennt ist (Kabelisolierung, Plasmamembran). Die Anwendung von Kabelgleichungen auf eine cylindrische Muskelfaser geht auf Hodgkin and Rushton (1946) zurück.

Wenn man durch eine intrazelluläre Mikroelektrode an der Stelle $x = 0$ einer Muskelfaser einen Strom aufzwingt, so ist der longitudinale Strom (i_1) gleich:

$$i_1 = \frac{dV}{dx} / r_1 \quad (1)$$

Nach Kirchhoff's Gesetz ist die Summe aller Ströme die in einem Punkt fließen gleich Null; daraus folgt:

$$i_m = - \frac{di_1}{dx} \quad (2)$$

Der Membranstrom fließt durch die Membranimpedanz, welche aus einer Kapazität C_m (Farad/cm²) und einem parallel geschalteten Widerstand r_m ($\Omega \cdot \text{cm}$) besteht. Daraus folgt:

$$i_m = C_m \frac{dV}{dt} + \frac{V}{r_m} \quad (3)$$

Differenziert man (1) nach x , so ergibt sich:

$$\frac{d^2V}{dx^2} = \frac{di_1}{dx} \cdot r_1 \quad (4)$$

Aus ((2) und (4)) und (3):

$$\frac{d^2V}{dx^2} = i_m \cdot r_1 = (C_m \frac{dV}{dt} + \frac{V}{r_m}) r_1 \quad \text{oder}$$

$$\frac{d^2V}{dx^2} = r_1 \cdot C_m \frac{dV}{dt} + r_1 \frac{V}{r_m} \quad \text{oder}$$

$$2 \cdot \frac{d^2V}{dx^2} - \lambda_m \frac{dV}{dt} - V \quad (5)$$

$$\text{wo } \lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_1}} ; \quad \tau = r_m \times C_m$$

Die Lösung zu dieser Differentialgleichung ist:

$$V_{(X,T)} = \frac{V(X=0, T=\infty)}{2} \left\{ e^{-X} \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{X}{2\sqrt{T}} - \sqrt{T} \right) \right] - e^X \rightarrow \right. \\ \left. \rightarrow \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{X}{2\sqrt{T}} - \sqrt{T} \right) \right] \right\} \quad (6)$$

$$\text{wo } X = \frac{x}{\lambda}$$

$$T = t/\tau$$

Für $T = \infty$, d.h. für $\frac{dV}{dt}$ in (6) = 0

vereinfacht sich die Lösung zu:

$$V_{(X,\infty)} = V_{(0,\infty)} e^{-X/\lambda} \quad (7)$$

Diese Gleichung kann nun benutzt werden, um λ zu be-

stimmen: $\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_1}}$

Im Falle wo $x = \lambda$:

$$V_{(X,\infty)} = V_{(0,\infty)} \cdot 0,37$$

Dies macht anschaulich, daß die Längskonstante den Abstand von der Stromelektrode repräsentiert, bei welcher die beobachtete Membranpotentialauslenkung nur noch 37% ausmacht von der Potentialauslenkung bei der Stromelektrode. λ kann also leicht experimentell bestimmt werden.

Für $x = 0$ lautet die Lösung zu (5):

$$V_{(0,t)} = V_{(0,\infty)} \operatorname{erf} \left(\frac{t}{\tau} \right) \quad (8)$$

$$\operatorname{erf}(1) = 0.84$$

Von der Zeit, die verstreicht, bis die Membranauslenkung bei der Stromelektrode 84% ihres endgültigen Wertes erreicht, kann also die Zeitkonstante τ bestimmt werden. Eine andere Möglichkeit τ zu bestimmen beruht auf einer empirischen Beziehung zwischen dem zeitlichen Verlauf der Membranpolarisation und dem Abstand von der Stromelektrode (Hodgkin/Rushton 1946):

Trägt man die Zeit, die die Membran an verschiedenen Stellen braucht um halbmaximale Auslenkung zu erfahren gegen die jeweilige Entfernung von der Stromelektrode auf, so erhält man eine Kurve, die nahezu eine gerade Linie ist und die eine Steigung von $2\lambda/\tau$ aufweist. Wenn λ bekannt ist, kann man daraus τ berechnen.

Ein dritter Weg τ zu erhalten ist nach Hodgkin/Rushton (1946) folgender: Der Schnittpunkt obenbeschriebener Kurve mit der Y-Achse, also die Zeit bis zu halbmaximaler Membranauslenkung bei der Stromelektrode ist genau gleich $\tau/4.398$.

Der Eingangswiderstand $= \frac{V(0, \infty)}{I_0}$. V und I_0 , also

auch R_{in}^0 können experimentell bestimmt werden.

Der Plasmawiderstand (r_l) und der Membranwiderstand (r_m) können wie folgt von Messungen von λ und R_{in}^0 bestimmt werden:

$$r_l = \frac{2 R_{in}^0}{\lambda} \cdot \left[\frac{\lambda}{cm} \right] \quad (9)$$

$$r = 2 \lambda R_{in}^0 \quad [\lambda \cdot cm] \quad (10)$$

Wie aus (12) hervorgeht, können die Kabeleigenschaften nur bestimmt werden, wenn entweder der Muskelfaserdurchmesser oder der spezifische Widerstand des Myoplasmas bekannt sind. Nach Falk & Fatt (1964), Hodgkin & Nakajima (1970) kann man davon ausgehen, daß in normalen Muskelfasern R_l konstant ist und ca. 200 $\Omega \cdot cm$ beträgt. In verschiedenen hypertonen Lösungen nimmt die Ionenkonzentration verschieden stark zu, je nachdem wie permeabel die Membran für die gelösten Teilchen und Wasser ist. Da für Glycerin bestimmte Diffusionsbarrieren vorhanden zu sein scheinen (Dulhunty und Gage 1973) wurde R_l indirekt nach Gleichung (12) durch Messung des Faserdurchmessers bestimmt.

Die Werte von r_m und r_l verhalten sich umgekehrt zur Größe der Muskelfaser. Der spezifische Widerstand von einem cm^2 Membran (R_m) und der spezifische Widerstand eines cm^3 Sarcoplasmas (R_l) sind gegeben durch die Beziehungen:

$$r_m = \frac{R_m}{2\pi\varphi} \quad (11)$$

und

$$r_l = \frac{R_l}{\pi\varphi^2} \quad \varphi = \text{Radius der Muskelfaser} \quad (12)$$

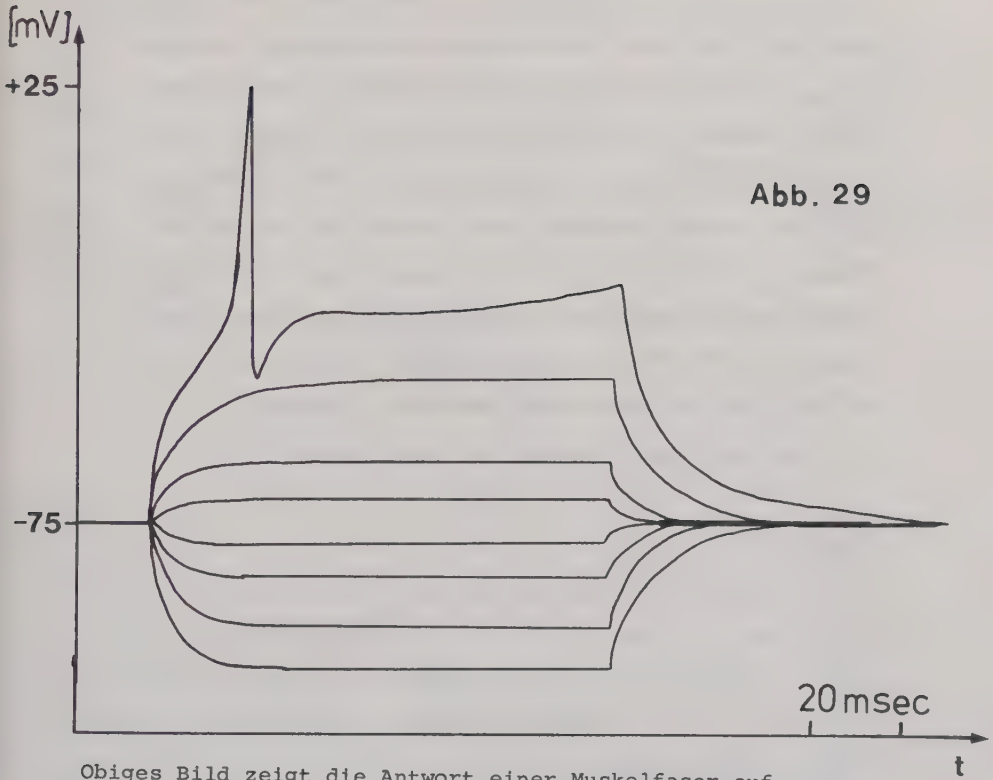


Abb. 29

Obiges Bild zeigt die Antwort einer Muskelfaser auf Rechteckimpulse verschiedener Intensität. Mehrere Kurven wurden übereinander projiziert. Bei Überschreiten des Schwellenpotentials antwortet die Membran mit der Bildung eines Aktionspotentials. Da die Kabelanalyse voraussetzt, daß sich der Membranwiderstand nicht ändert, wurde die Größe der Rechteckimpulse normalerweise so gewählt, daß die resultierenden Potentialauslenkungen nicht mehr als ± 10 mV betragen.

Im Folgenden sei die Kabelanalyse an einem praktischen Beispiel demonstriert:

Abbildung 30 zeigt die graphische Ermittlung von R_{in}^0 . Der Logarithmus der Membranpotentialauslenkung gemessen an verschiedenen Punkten der Membran nach einem Stromimpuls bekannter Größe wurde gegen die jeweilige Entfernung des Meßpunktes von der Stromelektrode aufgetragen. Die Kurve stellt annähernd eine Gerade dar. Durch Verlängern der Kurve bis zum Schnittpunkt mit der Y-Achse erhält man die Membranauslenkung direkt bei der Stromelektrode. $(V^0)/I^0$ ergibt dann R_{in}^0 . Aus der gleichen Kurve kann man auch λ ablesen; λ = dem Wert von x bei dem ΔV genau 37% ΔV^0 ist.

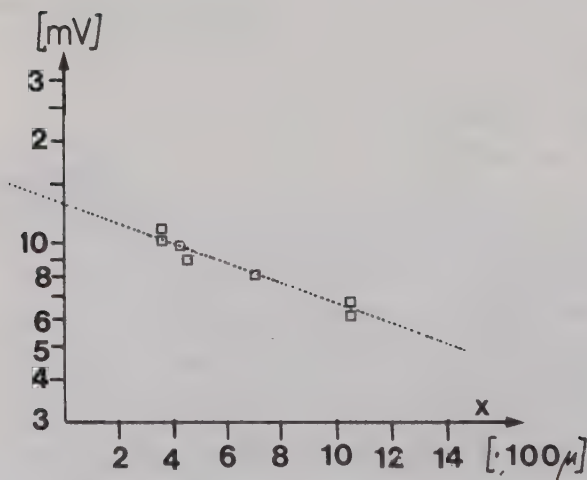


Abb. 30: Abszisse: Entfernung der Spannungselektrode von der Stromelektrode (x)
 Ordinate: Logarithmus der Membranpotentialauslenkung (ΔV)

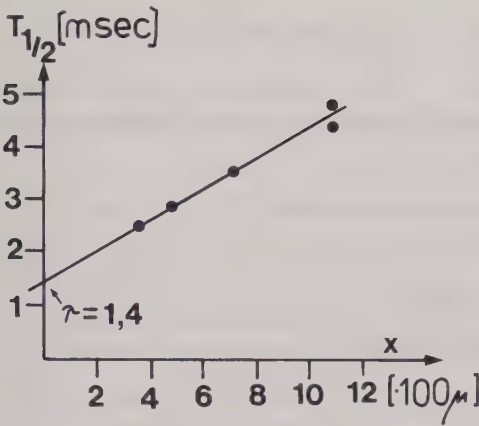


Abb. 31; Abszisse: Entfernung der Spannungselektrode von der Stromelektrode (x)

Ordinate: Zeit bis zur halbmaximalen Membranpotentialauslenkung ($T_{1/2}$).

In Bild 31 ist die Zeit bis zum halbmaximalen Wert von ΔV gegen x aufgetragen. Sowohl aus der Steigung der erhaltenen Geraden als auch aus dem y-Schnittpunkt kann die Zeitkonstante bestimmt werden.

Bei der Auswertung der experimentellen Daten wurden die Werte für ΔV^0 , λ und τ nicht wie in diesem Beispiel graphisch ermittelt, sondern aus Zeitgründen und der besseren Genauigkeit wegen auf einem Tischcomputer (Hewlett Packard) kalkuliert.

Die nach der dritten Methode (vgl. Seite 77, unten: $T_{1/2}^0 \times 4.398$) erhaltenen Werte für τ unterschieden sich oft von den auf beide andere Methoden ermittelten Werten. Der Wert dieser Methode wurde deshalb nicht berücksichtigt. Bei geringen Unterschieden zwischen den beiden anderen Werten wurde das Mittel genommen; bei größeren Unterschieden wurden die Daten nicht ausgewertet.

Abkürzungen im Kapitel über die Kabelanalyse

- x = Entfernung der Spannungselektrode von der Stromelektrode
 i_l = Longitudinaler Strom im Myoplasma
 r_l = Longitudinaler Myoplasmawiderstand
 r_m = Membranwiderstand
 V = Membranpotentialauslenkung
 i_m = die Membran passierender Strom
 λ = Längskonstante
 τ = Zeitkonstante
 R_m = spezifischer Membranwiderstand
 R_l = spezifischer Sarkoplasmawiderstand
 ρ = Muskelfaserradius
 C_m = Membrankapazität

Literaturverzeichnis:

- Adrian R.H., and Freygang W.H., (1962) The Potassium and Chloride conductance of frog muscle membran. J. Physiol. 163 pp 61 - 103.
- Armstrong C.M. (1974) Ionic pores, Gates and Gating Currents Quarterly Rev. of Biophysics 7 (2): 179.
- Bianchi C. Paul, Shanes A.M. (1959) Calcium influx in sceletal muscle at rest, during activity and during potassium contracture. J.Gen Physiol. 42 pp 803 - 815.
- Bozler Emil (1961) Distribution of nonelectrolytes in muscle. American J. Physiol. 200 pp 651 - 655.
- Buchthal F., Knudsen Sten (1959) Impulse propagation in striated muscle fibers and the role of the internal currents activation. Ann.N.Y.Acad.Sci.81, Art. 2 pp 422 - 445.
- Caputo Carlo (1968) Volume and twitch tension changes in striated muscle fibers in hypertonic solutions.J.Gen. Physiol. 52 pp 793 - 808.
- Carvalho Arselio P., Leo Barbara (1967) Effects of ATP on the interaction isolated from rabbit sceletal muscle.J.Gen. Physiol. 50 pp 1327 - 1352.
- Dulhunty A.F., Gage P.W. (1973) Differential effects of glycerol treatment on membrane capacity and excitation-contraction-coupling in toad sartorius fibers. J.Physiol. 2341 pp 373 - 408.
- Eisenberg Brenda, Eisenberg R.S. (1968) Selective distribution of the sarcotubular system in frog sartorius muscle. J.Cell.Biol. 39 pp 451 - 467.
- Eisenberg R.S. (1967) The equivalent circuit of single crab muscle fibers as determined by impedance measurements with intracellular electrodes. J.Gen. Physiol. 50 pp 1785 - 1820.

- Eisenberg R.S., Gage P.W. (1969) Actionpotentials, afterpotentials and excitation-contraction-coupling in frog sartorius fibers without transverse tubules. J.Gen.Physiol. 53 pp 278 - 297.
- Eisenberg R.S., Howell J.N., Vaughan P.C. (1971) The maintenance of resting potentials in glyceroltreated muscle fibers J.Physiol. 215 pp 95 - 102.
- Falk, Fatt (1964) Linear electrical properties of striated muscle fibers observed with intracellular electrodes. Proc.Roy.Soc.Sci.Ser.B. 160 pp 69 - 123.
- Freygang W.H. Jun., Goldstein D.A., Hellam D.C. (1964) The afterpotential that follows trains of impulses in frog muscle fibers. J.Gen.Physiol 47 pp 929 - 952.
- Freygang W.H. Jun., Goldstein D.A., Hellam D.C., Pechey L.D. (1964) The relation between the late afterpotential and the size of the transverse tubular system of frog muscle. J.Gen.Physiol 48 pp 235 - 263.
- Fujino M., Toshio Y., Suzuki K. (1961) Nature No. 4808 pp 1159 - 1161.
- Gage P.W., Eisenberg R.S. (1969) Capacitance of the surface and the transverse tubular membrane of frog sartorius muscle fibers. J.Gen.Physiol. 53 pp 265 - 278.
- Gonzalez-Serratos H. (1971) Inward spread of activation in vertebrate muscle fibers. J.Physiol. 212 pp 777 - 799.
- Hanson J., Persson A. (1971) Changes in the actionpotential and contraction of isolated frog muscle after repetitive stimulation. Acta.Physiol.Scand. 81 pp 340 - 348.
- Henderson (1970) Potassium exchange and afterpotentials in frog sartorius muscles treated with glycerol. J.Gen.Physiol. 56 pp 692 - 715.
- Herz R., Weber A. (1965) Caffeine inhibition of Ca^{++} uptake by muscle reticulum. Feder.Proc. 24 pp 208, 444.
- Hodgkin A.L., Horowicz P. (1957) The differential action of hypertonic solutions on the twitch and actionpotential of a muscle fiber. J.Physiol. 136 pp 17 P.

Hodgkin A.L., Horowicz P. (1959) The influence of K^+ - and Cl^- -ions on the membrane potential of single muscle fibers. J.Physiol. 148 pp 127 - 160.

Hodgkin A.L., Horowicz P. (1960) The effects of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibers. J.Physiol. 153 pp 370 - 385.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952) A quantitative description of the membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J.Physiol. 117,4 pp 500 - 544.

Hodgkin A.L., Makejima S. (1972) The effect of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscle fibers. J. Physiol. 221 pp 105 - 120.

Hodgkin A.L., Rushton W.A. (1946) The electrical constants of a crustacean nerve fiber. J.Gen.Physiol. 46 pp 444 - 479.

Howell J.N. (1969) A lesion of the transverse tubules of skeletal muscle. J.Physiol 201 pp 515 - 533.

Howell J.N., Jenden D.J. (1967) T-tubules of skeletal muscle: morphological alterations which interrupt excitation-contraction-coupling. Fed.Proc. 26 pp 553, 1663.

Huxley A.F., Taylor R.E. (1958) Local activation of striated muscle fibers. J.Physiol. 144 pp 426 - 441.

Katz B. (1948) The electrical properties of the muscle fiber membrane. Proc.Roy.Soc.SerB. 135 pp 506.

Krotenko S.A. (1969) Changes in the t-system of muscle fibers under the influence of influx and efflux of glycerol. Nature (London) 221 pp 966 - 968.

Macfarlane W.V., Meares J.D. (1958) Chemical modification of intracellularly recorded afterpotentials of frog skeletal muscle. J. Physiol. 142 pp 78 - 96.

Macfarlane W.V., Meares J.D. (1958) Intracellular recording of action and afterpotential of frog muscle between 0 and 45°C. J. Physiol. 142 pp 97 - 109.

Maeno T., Edwards C., Hashimura S. (1971) Difference in effects on endplate potentials between procaine and Lido-caine as revealed by voltage-clamp experiments.

Nakajima S., Hodgkin A.L. (1972) Effects of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscle. J.Physiol. 221 pp 105 - 120.

Peachey Lee D. (1965) Sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. J.Cell.Biol. 25 pp 209 - 231.

Schneider M. (1970) Linear electrical properties of the t-tubules and surface membrane of skeletal muscle fibers J.Gen.Physiol. 56,5 pp 640 - 671.

Lebenslauf

Am 23. Mai 1950 wurde ich als Sohn von Dr.med. Ernst D a u t und Ehefrau Elisabeth, geb. Schlotthauer in Kallstadt geboren. Dort verbrachte ich meine Kindheit und besuchte von 1957 an die Volksschule. 1961 wechselte ich zum Staatlichen Neusprachlichen Gymnasium in Bad Dürkheim, wo ich im Jahre 1969 die Abiturprüfung ablegte. Noch im gleichen Jahr begann ich an der Universität Heidelberg mein Medizinstudium. Mein bisheriger Studiengang gliedert sich folgendermaßen:

WS 69/70	Studienbeginn an der Univ. Heidelberg
SS 70	Vorphysikum an der Univ. Heidelberg
WS 70/71	Wechsel an die FU Berlin
SS 71	FU Berlin
WS 71/72	Physikum an der FU Berlin
SS 72	Erstes klin. Semester an der FU Berlin
WS 72/73	Fulbright Stipendium für experimentelle elektrophysiologische Arbeit an der University of Rochester, N.Y., USA
WS 73/74	Zweites klin. Semester an der FU Berlin
SS 74	Drittes klin. Semester an der Univ. München
WS 74/75	Uni München
SS 75	Uni München
WS 75/76	Uni München
SS 76	Uni München Beendigung des klin. Studiums
Herbst 76	Medizinisches Staatsexamen

München, im Herbst 1976

